



Rapport d'activité 2008
des plates-formes de l'IBMP

- ✓ Production de plantes
- ✓ Séquençage d'ADN
- ✓ Q-PCR
- ✓ Imagerie & Microscopie
- ✓ Cytologie
- ✓ Bio-informatique
- ✓ Biologie structurale
- ✓ Bio-Image
- ✓ Métabolomique
- ✓ Protéomique

INSTITUT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE DES PLANTES (IBMP) – UPR 2357

SOMMAIRE

Introduction

Les plates-formes technologiques sont des instruments de la politique scientifique de l'IBMP tendue vers un objectif d'excellence.

Nos plates-formes sont pilotées par des ingénieurs au service de l'ensemble des équipes de recherche (IBMP et extérieures), parfois également de sociétés privées désirant utiliser les services de la plate-forme. Afin d'en promouvoir leur transparence d'utilisation, depuis 2005, chaque responsable de plate-forme rédige un rapport d'activité annuel transmis au Collège de direction (anciennement Conseil scientifique) de l'IBMP ainsi qu'à chaque chef de groupe.

Alors que ce rapport était d'abord pensé comme un outil interne servant la politique de la direction, très rapidement il est apparu nécessaire de le diffuser à l'ensemble de nos partenaires ayant participé au financement des équipements présents sur les plates-formes.

Le rapport 2008 présente 10 plates-formes dont 7 sont spécifiques à l'IBMP et 3 s 'inscrivent dans un contexte inter-Unités, à savoir Imagerie & Microscopie (intégrée à la plate-forme d'imagerie cellulaire de l'Esplanade), Bio-Image (en lien avec l'IBMC, GMGM, et le Jardin Botanique), et la protéomique (plate-forme commune avec l'IBMC).

Le rapport 2008 faire apparaître deux points majeurs.
Le taux d'utilisation des plates-formes est très élevé. Par exemple, en Imagerie & Microscopie, les 2 instruments majeurs, 2 microscopes confocaux, représentent 9h (pour le plus récent) et 6,5h (pour le second) d'utilisation par jour ouvrable, comptant 250 jours ouvrables /an.
La production de plantes ne cesse de croître (30 000 en 2000, 165 000 en 2008) pour atteindre un seuil proche de la saturation dû à nos surfaces limitées. Le projet VEGOIA d'extension de l'IBMP a pour but d'augmenter nos capacités de production de plantes.
En 2008, 30 000 séquençages d'ADN et 92 000 réactions Q-PCR ont été réalisés.
Les plates-formes participent activement à l'excellence des résultats de l'IBMP (l'Unité est notée A+ dans le dernier rapport de l'AERES). Par exemple, la plate-forme d'Imagerie et de Microscopie contribue pour 60% des publications de l'IBMP avec un facteur moyen d'impact de 8,4 alors qu'il est de 8,0 pour l'ensemble des publications de l'IBMP.

La politique de la direction vise à soutenir l'effort d'investissement dans les équipements de plates-formes pour soutenir une recherche dynamique et innovante. En 2009, il est prévu le remplacement du microscope confocal le plus ancien pour un nouveau modèle plus performant. Nous venons de recevoir un avis favorable dans le cadre de l'appel d'offre PPF 2008 pour le projet de microscope confocal de type spinning disc dont l'achat est prévu en 2010. Le CNRS vient d'ouvrir un concours pour le recrutement d'un ingénieur de recherche dont la mission sera d'une part, de mettre en place une nouvelle plate-forme de production de protéines par systèmes d'expression hétérologue et d'autre part de contribuer à la plate-forme protéomique commune IBMC-IBMP en contribuant à l'étape de séparation 2D des protéines, étape préalable à l'analyse par spectrométrie de masse réalisée à l'IBMC.

Pascal Genschik, directeur

Serge Kauffmann, directeur adjoint

Plate-forme Production de plantes

Richard Wagner
Michel Kerneis
Sébastien Staerck
Aurélie Bailly

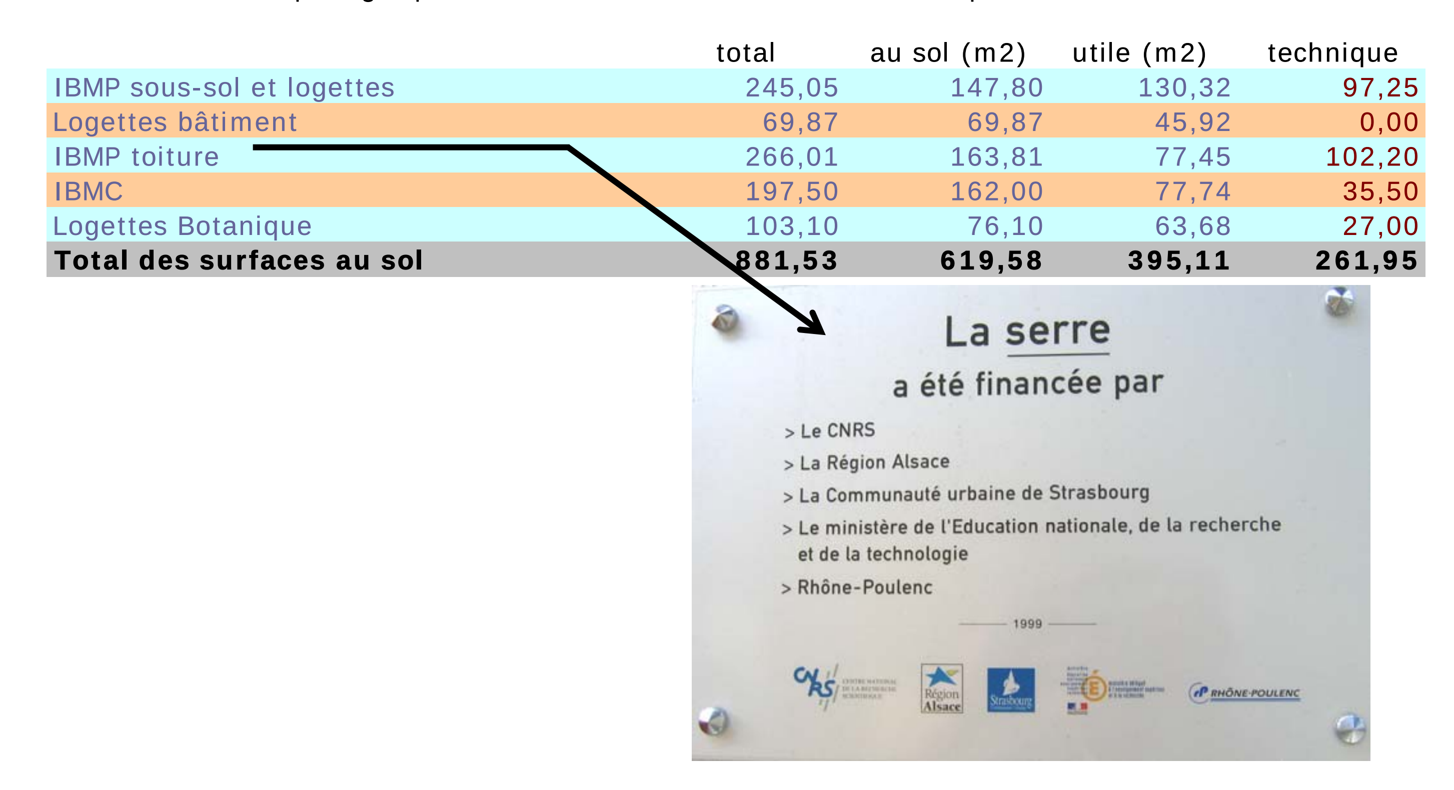
PLATE-FORME DE PRODUCTION DE PLANTES
RICHARD WAGNER

1/ Présentation de la plate-forme serre et caractéristiques de nos unités de cultures de plantes expérimentales

Le service serres est composé de 4 serristes CNRS et d'un agent universitaire à mi-temps et a pour rôle de produire les plantes expérimentales pour l'ensemble de l'institut en répondant au mieux aux besoins expérimentaux, règlementaires et en veillant également à l'entretien et au bon fonctionnement de nos outils de production.

Nos unités de production sont réparties sur 3 sites géographiques identifiés : IBMP, IBMC et BOTANIQUE.
Le tableau ci-dessous résume l'ensemble de nos surfaces de culture IBMP.

- Total représente la somme de la surface au sol et technique
- Au sol représente la totalité des surfaces de culture au sol
- Utile représente la surface de culture dédiée aux plantes (tablettes) sans les allées dans les serres et les logettes.
- Technique regroupe les surfaces des locaux de travail et techniques



	total	au sol (m2)	utile (m2)	technique
IBMP sous-sol et logettes	245,05	147,80	130,32	97,25
Logettes bâtiment	69,87	69,87	45,92	0,00
IBMP toiture	266,01	163,81	77,45	102,20
IBMC	197,50	162,00	77,74	35,50
Logettes Botanique	103,10	76,10	63,68	27,00
Total des surfaces au sol	**881,53**	**619,58**	**395,11**	**261,95**

2/ Coûts d'utilisation

Les coûts de la culture de plantes expérimentales englobent la fourniture des matières premières, les fluides, la main d'œuvre, l'amortissement (sur 10ans) et l'entretien des installations pour une durée donnée et un type d'expérience souhaité par les chercheurs.
Vu la saturation de nos unités de production, nous ne pouvons répondre que parcimonieusement à des demandes extérieures.
Le tableau ci-dessous donne les coûts calculés sur la base de la taille des pots de culture et du temps de culture. Des tarifs « partenaires » et « non-partenaires » sont proposés à partir de ces coûts.

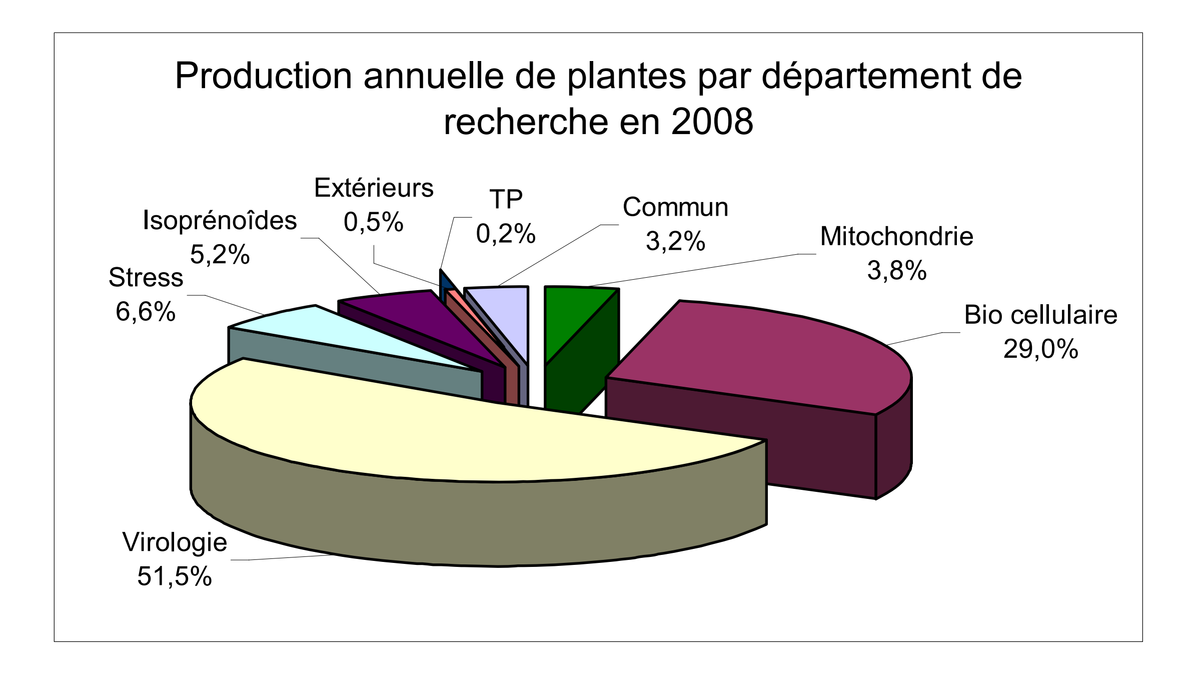
Dimension du pot (∅ cm)	7/7/6,2	8	9	10	11	13	16	19	32	50
Prix du pot	0,02€	0,02€	0,04€	0,03€	0,00€	0,04€	0,10€	0,12€	0,00€	4,68€
Prix du terreau / pot	0,02€	0,01€	0,03€	0,04€	0,05€	0,08€	0,15€	0,24€	1,09€	4,55€
Eclairage (Kw / m^2 / jour)	0,23€	0,23€	0,23€	0,23€	0,23€	0,23€	0,23€	0,23€	0,23€	0,23€
Forfait eau	0,003€	0,003€	0,003€	0,003€	0,003€	0,003€	0,003€	0,003€	0,003€	0,003€
Entretien[1] (€ / m^2 / jour)	0,18€	0,18€	0,18€	0,18€	0,18€	0,18€	0,18€	0,18€	0,18€	0,18€
Forfait amortissement	0,20€	0,20€	0,20€	0,20€	0,20€	0,20€	0,40€	0,40€	1,00€	1,00€
Fournitures diverse[2] (€ / m^2 / jour)	0,17€	0,17€	0,17€	0,17€	0,17€	0,17€	0,17€	0,17€	0,17€	0,17€
Nombre de pot / m^2	120	90	72	60	48	34,8	23,4	16,2	3,6	1,6
Nombre de jours de culture	60	60	60	60	60	60	90	90	360	360
Coût unitaire, hors frais de personnels	0,53€	0,62€	0,75€	0,84€	0,98€	1,33€	2,88€	3,98€	60,03€	140,58€
Forfait Main d'œuvre[3]	0,50€	0,50€	0,50€	0,50€	0,90€	0,90€	1,50€	1,50€	5,00€	5,00€
Coût unitaire, frais de personnels inclus	1,03€	1,12€	1,25€	1,34€	1,88€	2,23€	4,38€	5,48€	65,03€	145,58€
Tarif "partenaires"	0,55€	0,65€	0,75€	0,85€	1€	1,35€	2,90€	4€	60€	140€
Tarif "non-partenaires"	1,05€	1,15€	1,25€	1,35€	1,90€	2,20€	4,40€	5,50€	65€	150€

3/ Recettes de la plate-forme serres

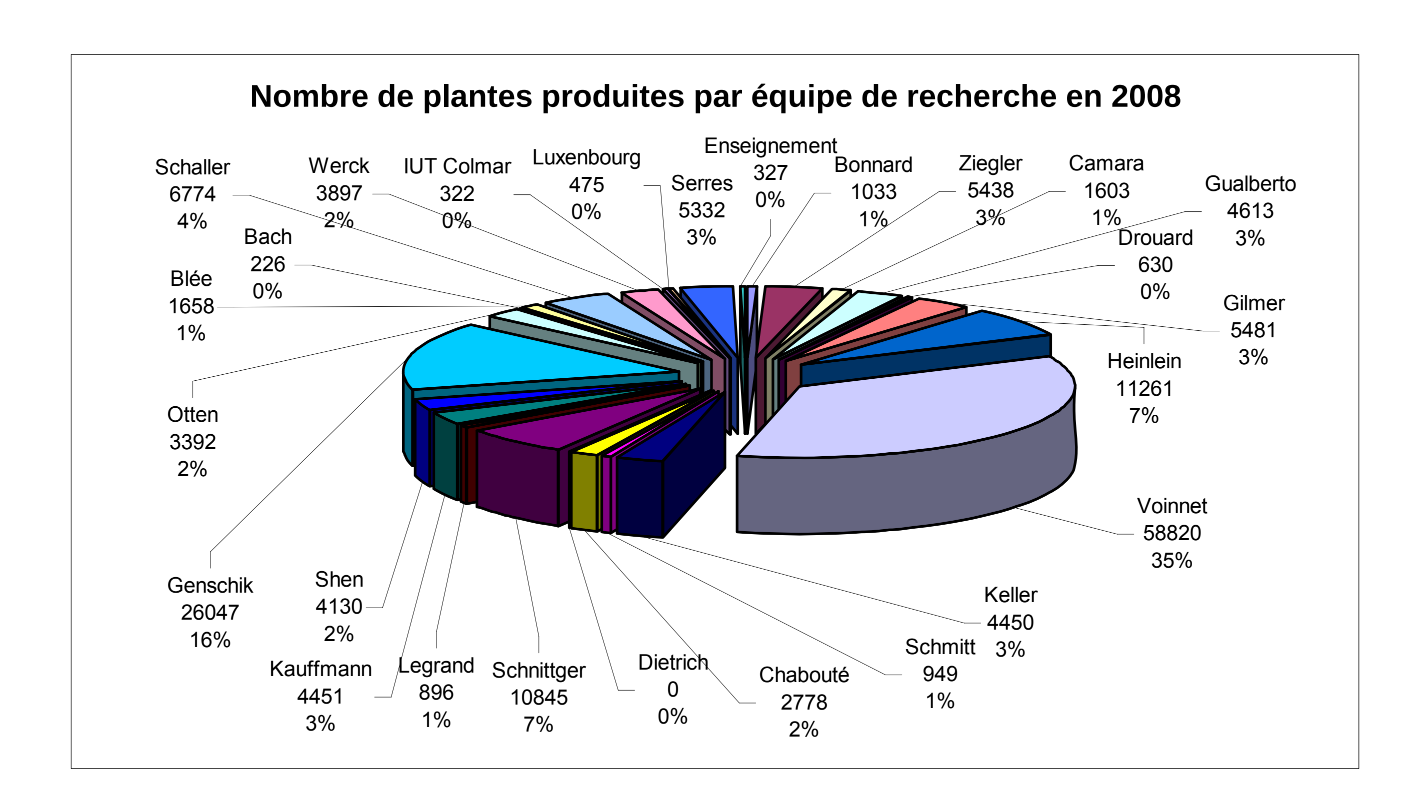
Les facturations 2008 de plantes expérimentales produites pour les partenaires ou les clients extérieures à l'IBMP sont basées sur les chiffres ci-dessus.
En 2008 la plate-forme n'a facturé aucune prestation ; certains prestataires avaient un reliquat de trop perçu en 2007.

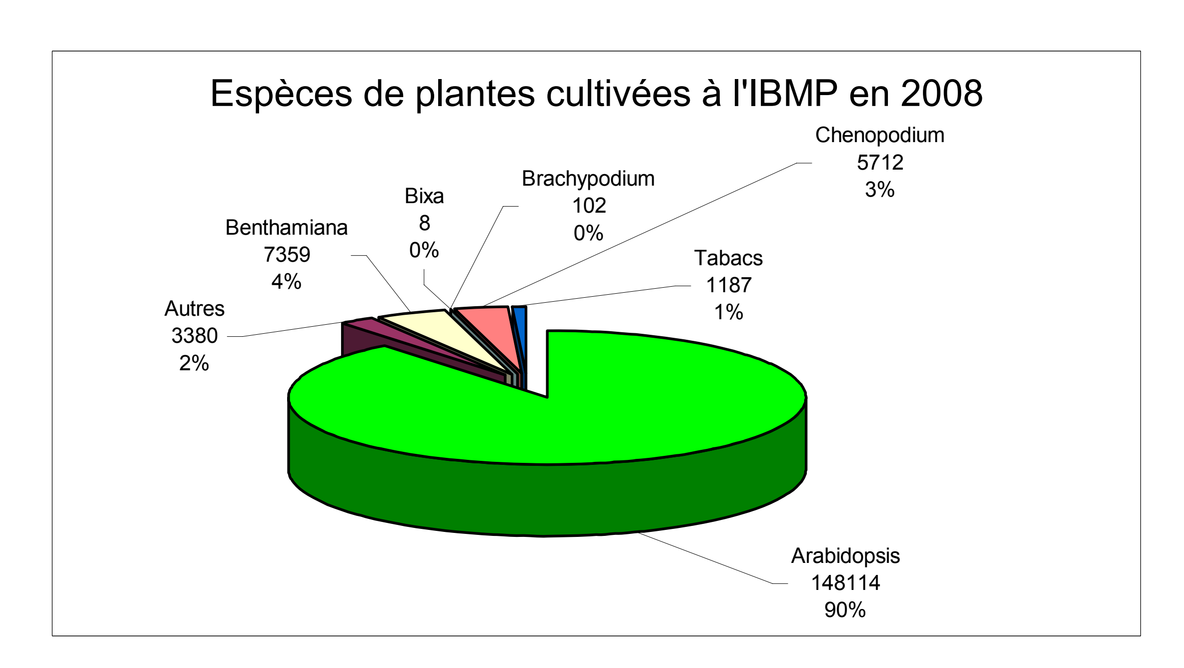
4/ Activité et utilisateurs de la plate-forme.

En 2008 le service a produit 165 000 plantes d'une quinzaine d'espèces différentes.

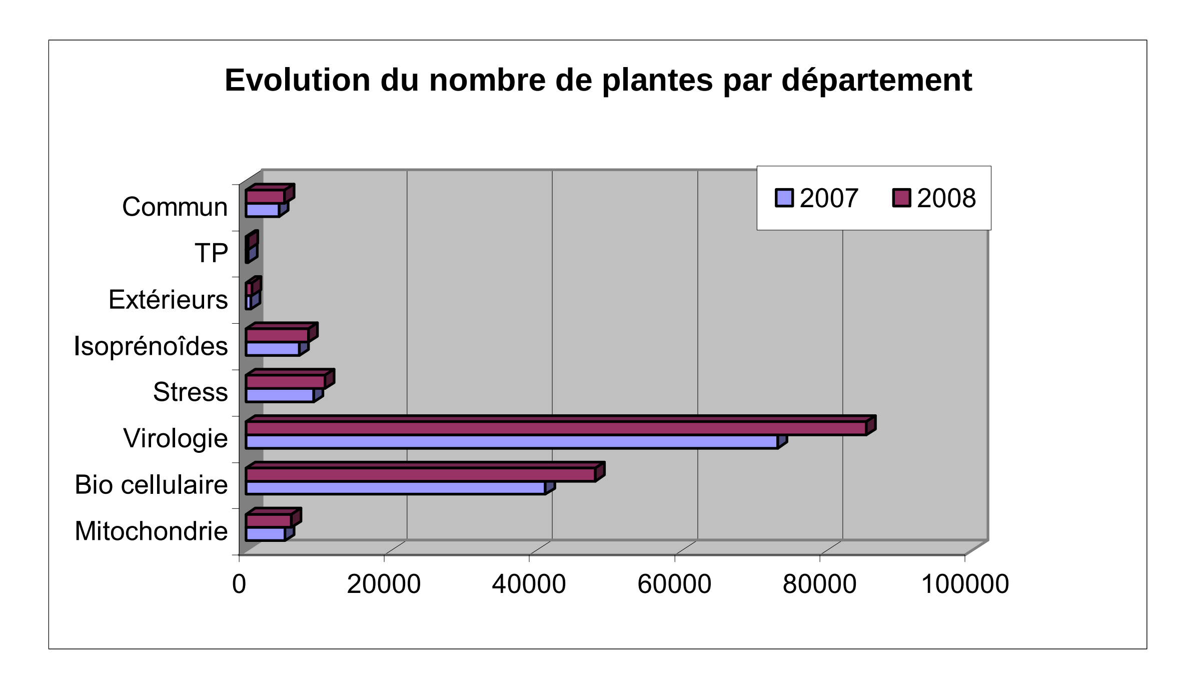


Il est à noter que 2 départements de recherche « Biologie cellulaire » et « Virologie » sont les principaux demandeurs en plantes : ils représentent 80.5% de notre production en 2008, principalement *Arabidopsis thaliana*.





Autres : représente toutes les autres plantes : Œillet d'inde, Kalanchoe, Navet, Colza, Poivron, Lotus, Petit pois, Pomme de terre, Tomate, Ipomée, Phyllanthus, Clevelendii.



La production annuelle de plantes expérimentales de la plate-forme Serres est en progression de 9% par rapport à 2007 et représente 13 000 plantes supplémentaires cultivées sur l'année 2008. Les tests et la mise en route de *plantiquette* peuvent entraîner des variations de 2 à 5 % sur la production de l'année.

5/ Veille technologique.

Mise aux normes

Mise aux normes des logettes « *Arabidopsis* » à l'IBMP et en Botanique par la mise en place d'un système de récupération des graines au niveau des écoulements, obligatoire pour la culture d'*Arabidopsis*. Une étude de faisabilité sera réalisée début 2009.
(Voir site du CNRS http://www.cnrs.fr/infoslabos/reglementation/CGGplantes.htm)

Réaménagement de surfaces de culture

L'accueil d'une nouvelle équipe en fin d'année 2007 a généré de nouveaux besoins en termes de production de plantes. Nous y avons répondu partiellement par le réaménagement en luminaire d'une serre IBMC. Cette serre de type S1 accueille des plantes obtenues par mutation chimique et elle est tout à fait adaptée ce type de culture. Une réflexion du devenir des serres IBMC devrait être menée rapidement et prendre en compte l'avancée du projet d'extension de l'animalerie prévu à l'IBMC. En cas d'aboutissement de ce projet d'animalerie, nos serres IBMC seraient démolies et nous perdrions environ 20% de notre surface totale de culture.

Prévoir une action annuelle de réaménagement de nos surfaces de culture, permettrait de répondre progressivement aux besoins toujours croissants en plantes et ne pénaliserait pas trop fortement l'institut en cas de cette perte de surface.

Un besoin d'aménagement en conditions stables et reproductibles toute l'année dédié à l'observation et à la mesure de pollen et de graines de Brachypodium et d'Arabidopsis.
Il faudrait prévoir une logette (316) pour Brachypodium et une logette (513) pour Arabidopsis. Le coût prévisionnel de l'aménagement se situe autour de 60000€.

Local pour armoire climatique

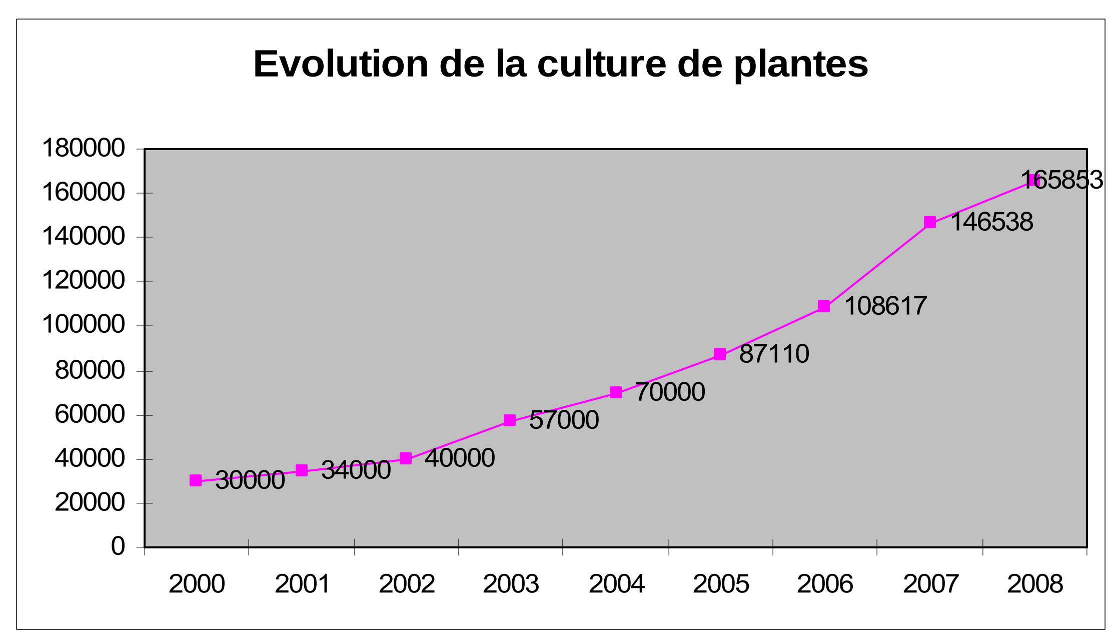
Un besoin grandissant de petite surface pour des conditions de culture particulières et ponctuelles est exprimé par un grand nombre d'équipes. Il serait bon de mener à bien une réflexion pour l'aménagement d'un local dédié à accueillir 8 à 10 armoires de culture pour répondre à moyen terme aux besoins exprimés (ex : menuiserie).

6/ Budget prévisionnel

Fonctionnement courant	36 000,00 €
Réparations	20 000,00 €
Contrat de maintenance	5 000,00 €
Proposition d'achat	60 000,00 €
Total	121 000,00 €

7/ Remarques - Perspectives.

Augmentation de la production annuelle
L'accueil de nouvelles équipes en 2002, en 2007 et l'obtention 2 ERC en 2008 dynamise très sensiblement notre institut. Cela représente une charge de travail supplémentaire et une pression accrue sur les surfaces de culture avec l'augmentation de la densité de plantes. Depuis l'année 2000 notre production de plantes a été multipliée par 5,5 avec le même nombre de serristes et des réaménagements de surfaces de culture. Le service serres a toujours essayé de répondre au mieux à toutes les demandes. Cette augmentation de la charge de travail fait qu'actuellement nous sommes arrivés au maximum de nos capacités de production sans perte en qualité des plantes expérimentales cultivées ; sans moyen supplémentaire il sera très difficile de garantir le maintien de cette qualité.



Vieillissement des installations
Le temps et le soleil ont des effets sur les matériaux des serres, qu'il faudra intégrer dans le plan de maintenance de l'année 2009.

Remplacement des toiles d'ombrage de la serre toiture (20000€ environ)
Vérification et réfection de l'étanchéité des serres.
Vérification et graissage annuel des ombrages, moteurs, crémaillères, ouvrant, fin de course etc… (2000€ environ + remplacement de pièces)

Travail isolé
En l'absence de concierge à l'IBMP, il faut souligner un problème de sécurité dû au travail isolé des personnes effectuant les permanences et les chercheurs travaillant les week-ends.

Travaux d'installation de la machine à laver les contenants à la serre sous-sol
Pour répondre à l'augmentation constante des surfaces de culture Arabidopsis (50% par rapport à 2005) et de future transformation de logettes, une machine à laver industrielle a été achetée en décembre 2007 au prix de 11 175€ ht. Son installation a entraîné le réaménagement du local de travail sous-sol qui a été

effectué en début d'été 2008 au prix de 12 000€ environ. Cette installation est un réel gain de temps pour les serristes et financier pour l'institut. Cette machine à laver permet de nettoyer tous types de contenants ainsi que les aracons et les aratubes (non réutilisé jusqu'à présent). Sachant qu'en 2007 l'IBMP a dépensé 8169€ en aratubes et en aracons ; cet outil sera amorti en moins de 4 ans.

Plate-forme Séquençage d’ADN

Abdelmalek ALIOUA

PLATE-FORME DE SEQUENÇAGE D'ADN
ALIOUA ABDELMALEK

1/ Présentation de la plate-forme

1996 : Création du service de séquençage d'ADN
2002 : Mise en place d'une plate-forme fédérative de séquençage d'ADN
→ Partenariat pour l'acquisition d'un séquenceur à électrophorèse en capillaire (16x80cm) ABI3100 d'Appliedbiosystems :
- Région Alsace
- IBMP : UPR-CNRS 2357
- ULP : Laboratoire de Génétique, Microbiologie, Environnement
- Société Tépral (Brasseries Kronenbourg)- Strasbourg

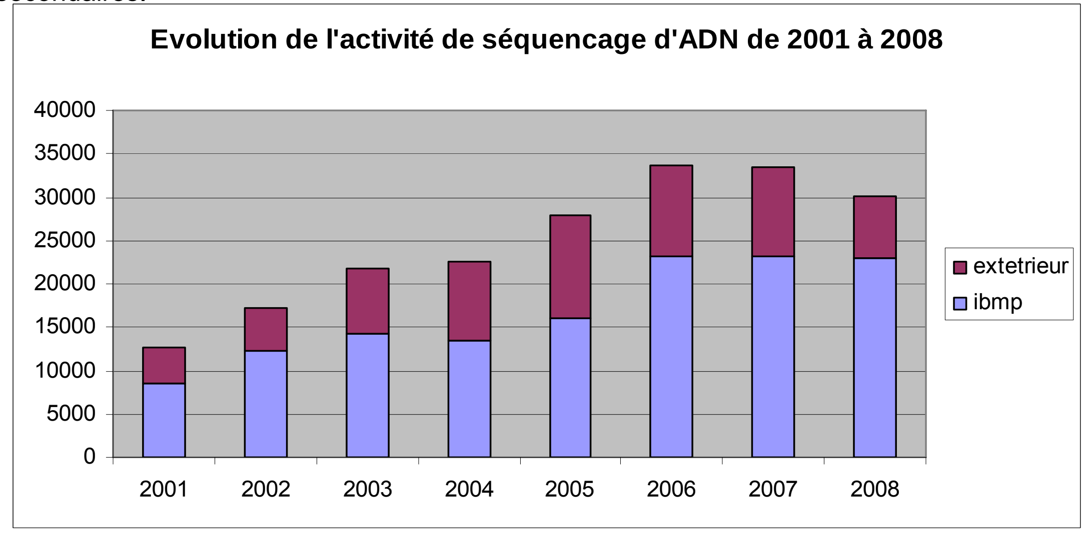
Personnel affecté à la plate-forme
- Mr Alioua Abdelmalek – ingénieur d'étude - IE2- CNRS, malek.alioua@ibmp-ulp.u-strasbg.fr

Equipements
-1 séquenceur à électrophorèse en capillaire (16 x 80cm) ABI 3130XL (acquis en 2002),
-1 station de pipetage (robot Biomek 3000) (acquis en 2006) : 35 000 euros, IBMP,
-2 thermocyclers ABI 9700 pour plaque PCR 96 puits,

Capacité d'analyse
Capacité théorique annuelle: 40 000 séquences de 900 à 1000 bp .
En 2008 :
- 30198 analyses
- 219 utilisateurs
- 17 laboratoires

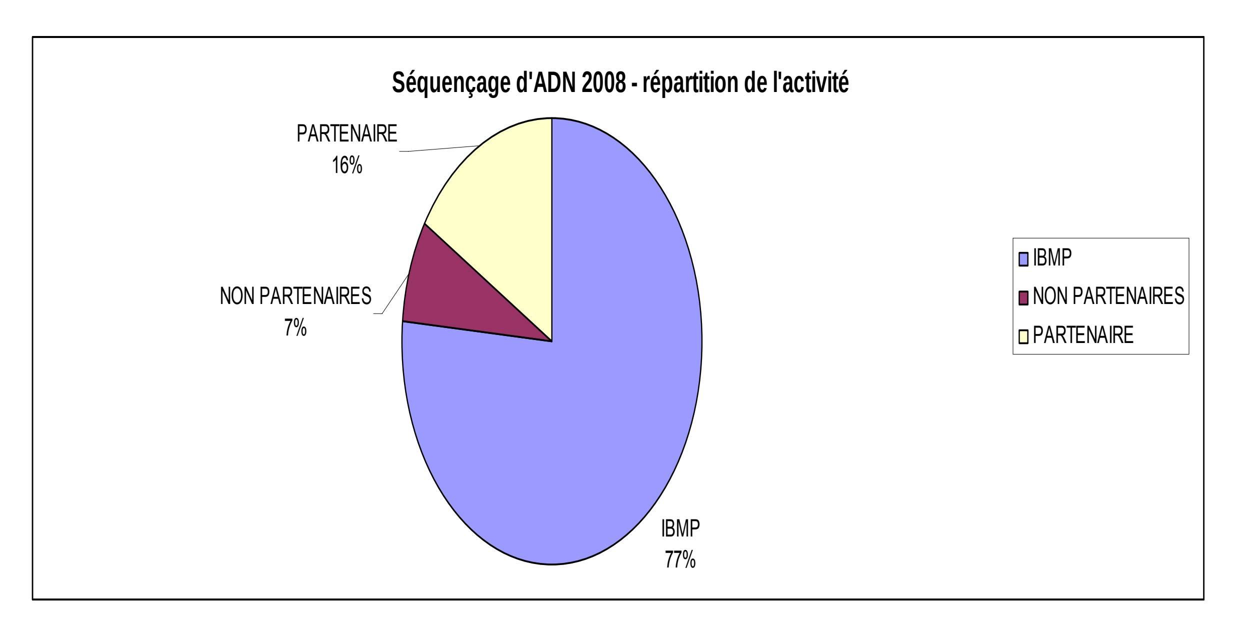
Missions
Le service est organisé en plate-forme fédérative de séquençage. Ses missions sont les suivantes :
- Réalisation des réactions de séquençage d`ADN à partir d`échantillons d`ADN (plasmides divers ou produits de PCR) préalablement purifiés et quantifiés.
- Transmission des résultats en toute confidentialité sous forme de fichiers informatiques.
- Optimisation des protocoles de séquençage et de génotypage.
- Veille technologique
- Gestion administrative et financière de la plateforme.

Expertise
Le service assure un suivi personnalisé de la production incluant :
- un contrôle visuel quotidien réalisé sur l`ensemble des séquences ;
- une notation des séquences selon la longueur de lecture (contrôle de résolution) ;
- un diagnostique des problèmes de séquençage d'ADN (qualité d'échantillon, présences d'impuretés type sels ou autre, concentration d'échantillon, clonage, mélange de matrices, hybridation des amorces, structures secondaires.



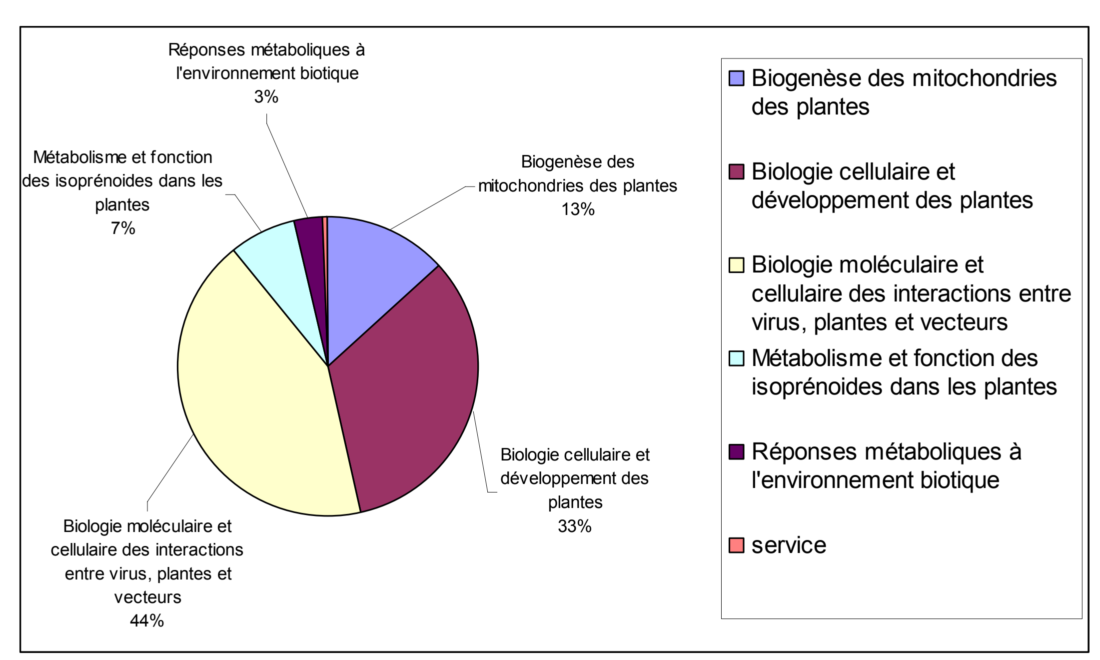
2/ Activité en 2008

En 2008, l'activité du service s'élève à 30198 analyses. La répartition des travaux de séquençage entre l'IBMP et les utilisateurs externes est de l'ordre de 3/4-1/4.



Bilan IBMP

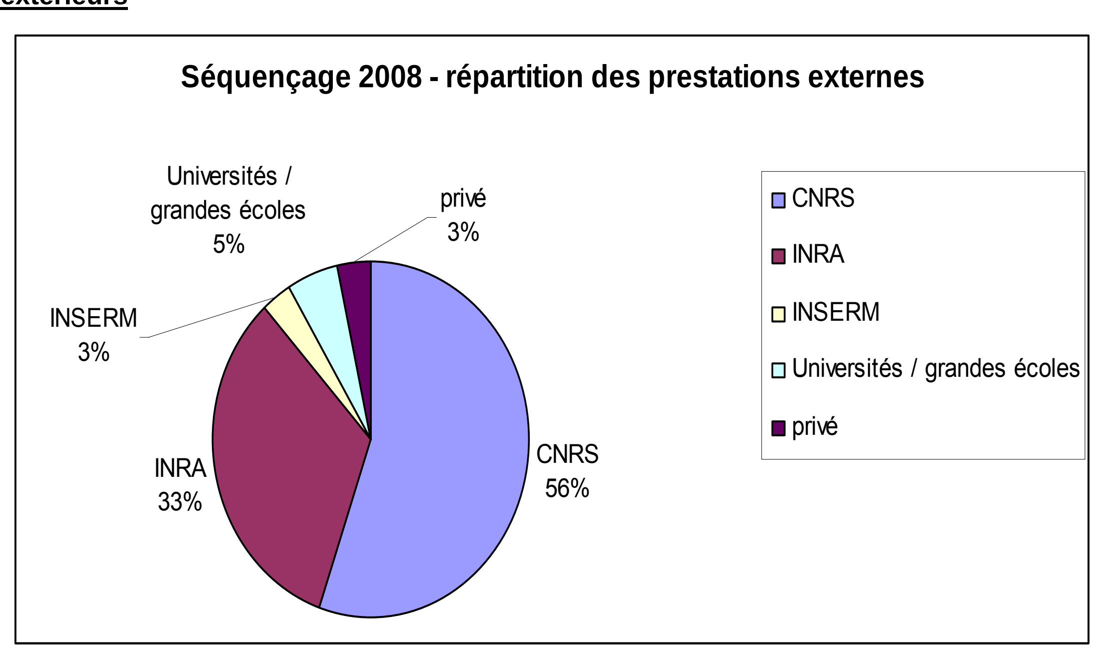
5 départements
22 équipes
128 utilisateurs



Départements scientifiques de l'IBMP	Equipe	Nbre de séquences
Biogenèse des mitochondries des plantes	bonnard	692
	dietrich	651
	drouard	606
	gualberto/gagliardi	1102
	TOTAL	3051
Biologie cellulaire et développement des plantes	chaboute	384
	genschik	4218
	otten	448
	schmit	507
	Schnittger	795
	shen	1290
	TOTAL	7642
Biologie moléculaire et cellulaire des interactions entre virus, plantes et vecteurs	gilmer/ziegler-graff	2579
	heinlein/ritzenthaler	346
	keller/ryabova	939
	voinnet	6027
	TOTAL	9891
Métabolisme et fonction des isoprénoides dans les plantes	bach	666
	camara	616
	legrand	51
	schaller	353
	TOTAL	1686
Réponses métaboliques à l'environnement biotique	blee	49
	legrand	16
	schaller	11
	werck	651
	TOTAL	727
Service		101
TOTAL IBMP		**23098**

Bilan utilisateurs extérieurs

5 organismes publics et privés
16 laboratoires
91 utilisateurs



CNRS	ESBS	UPR 7175	1342
	CENTRE DE NEUROCHIMIE	UPR-CNRS 2356	182
	IBMC	UPR-CNRS 9022	64
	GENETIQUE-IPCB	UPR 7156	2328
INRA	INRA COLMAR	BDV	359
	INRA COLMAR	GAV	258
	INRA COLMAR	ŒNOLOGIE	203
	INRA COLMAR	VIVE	775
	INRA COLMAR	VVA	749
INSERM	CANCEROLOGIE	HUS -CERALINE	94
	médecine/BACTERIOLOGIE	HUS-PREVOST	132
Universités / grandes écoles	UNIVERSITÉ DE REIMS	BBMP/ BAILLIEUL.F	321
	ulp-chimie	rohmer-m	47
	ensaia	HEHN A	4
Entreprises	GENE SIGNAL	COLIN S	42
	BRASSERIE KRONENBOURG	TEPRAL	194
TOTAL			**7094**

NB : en fond grisé les utilisateurs issus de laboratoires ou d'entreprise ayant participés à l'achat du séquenceur.

3/ Bilan financier

Coût séquençage 2008

pour 30 198 séquences	nb	P.U	Prix remisé HT
FG CAPILLARY 16X50 CM	3	891,00 €	2 272,05 €
FG GA 10X BUFFER/EDTA-25 ml	5	103,00 €	412,00 €
HI DI FORMAMIDE 25 mL	20	36,00 €	576,00 €
5x seq buffer medium	2	1 021,00 €	1 632,00 €
bulkpack 96 well rxn plate	1	2 140,00 €	1 498,00 €
FG 3130XL POP7-7 ml	3	422,40 €	1 267,20 €
nano-pop7-28 ml	9	227,50 €	2 047,50 €
BDT 5X BUFFER	1	113,75 €	113,75 €
10X CE RUNNING BUFFER	1	57,20 €	57,20 €
pointes p20	20	45,00 €	900,00 €
FILMS PCR ALUMINIUM	3	80,00 €	240,00 €
KIT 384 PUITS	1	800,00 €	800,00 €
BDTV3,1-1000 rxn	1	8 800,00 €	8 800,00 €
consommables magasin	1	842,00 €	842,00 €
contrat de maintenance	1	11 470,00 €	11 470,00 €
		TOTAL HT	32 927,70 €

Facturation

Base de calcul de la tarification

Consommables + maintenance	32 927,70 €
Amortissement du matériel (sur 5 ans)	13 800,51 €
Infrastructure (81,29€ /m^2)	1 560,77 €
Total des dépenses	48 288,98 €
Nb de réactions réalisées	30198
Coût unitaire, hors frais personnel	1,60 €
Frais de personnel/réaction (50%)*	1,17 €
Coût unitaire, frais de personnel inclus	2,77 €
Tarif appliqué aux partenaires	3,50 €
Tarif appliqué aux clients extérieurs non -partenaires	6,50 €

* : Les frais de personnel sont calculés sur la base de 50% du salaire annuel toutes charges comprises, car je suis à 50% sur la plate-forme de séquençage et à 50% sur la plate-forme de Q-PCR

Recettes

Département	Equipe/Unité	Tarif appliqué	Qté	nb de séquences non facturées*	total euros HT
ESBS	UPR 7175	6,50 €	1328		8 632,00 €
IBMC	UPR-CNRS 9022	6,50 €	64		416,00 €
INRA COLMAR	BDV	3,50 €	341	25	1 106,00 €
INRA COLMAR	GAV	3,50 €	272		952,00 €
INRA COLMAR	ŒNOLOGIE	3,50 €	203		710,50 €
INRA COLMAR	VIVE	3,50 €	775		2 712,50 €
INRA COLMAR	VVA	3,50 €	749		2 621,50 €
CENTRE DE NEUROCHIMIE	UPR-CNRS 2356	6,50 €	182		1 183,00 €
GENE SIGNAL	COLIN S	6,50 €	42		273,00 €
BRASSERIE KRONENBOURG	TEPRAL	3,50 €	194		679,00 €
GENETIQUE-IPCB	UPR 7156	3,50 €	2328	6	8 127,00 €
UNIVERSITÉ DE REIMS	BBMP/ BAILLIEUL.F	6,50 €	321		2 086,50 €
CANCEROLOGIE	HUS -CERALINE	6,50 €	94		611,00 €
médecine/BACTERIOLOGIE	HUS-PREVOST	6,50 €	132		858,00 €
ulp-chimie	rohmer-m	6,50 €	47		305,50 €
ensaia	HEHN A	6,50 €	4		26,00 €
		TOTAL	**7076**		**31 299,50 €**

En grisé, partenaires de la plate-forme

* : les séquences ne sont pas facturées lorsque le problème de séquençage est lié à un dysfonctionnement de la plate-forme. En 2008, cela représente 0,004% des demandes de séquences.

Le tableau ci-dessus représente la situation telle qu'elle aurait due apparaître de façon comptable. Cependant, il y a eu des retards de payement imputables pour une large part aux partenaires qui ne répondaient pas à nos demandes de payements, et pour une moindre part à notre manière de gérer la facturation.

Situation de la facturation de 2006 à 2008

année	recettes attendues (euros HT)
2006	47 184 €
2007	45 136 €
2008	31 513 €
Total	123 833 €

Organismes en attente de payement (à la date de rédaction du rapport)

	INRA de Colmar	INSERM	CNRS(ibmc)	UNIVERSITÉ DE REIMS
2006	2 342,54 €			
2007	4 935,00 €	1 267,00 €	182,00 €	112,00 €
2008	8 204,00 €	1 469,00 €	416,00 €	2 086,50 €
Total HT	15 481,54 €	2 736,00 €	598,00 €	2 198,50 €
Total HT	21 014,04 €			

En fond grisé, Partenaire financier à l'acquisition du séquenceur en 2002

Budget prévisionnel 2009

Pour 30 000 séquences	nb	Prix unitaire, HT	Prix remisé HT
FG CAPILLARY 16X50 CM	1	921,00 €	782,85 €
FG CAPILLARY 16X80 CM	1	921,00 €	782,85 €
FG GA 10X BUFFER/EDTA-25 ml	3	107,00 €	256,80 €
HI DI FORMAMIDE 25 mL	6	37,00 €	177,60 €
5x seq buffer medium	1	1 056,00 €	844,80 €
FG 3130XL POP7-7 ml	3	568,00 €	1 363,20 €
bulkpack 96 well rxn plate	1	2 140,00 €	1 500,00 €
FG 3130XL POP7-28 ml	3	500,00 €	1 385,00 €
BDTV3,1-1000 rxn	1	8 800,00 €	8 800,00 €
pointes p20	30	45,60 €	1 368,00 €
FILMS PCR ALUMINIUM	1	80,00 €	80,00 €
consommables magasin	1		1 000,00 €
contrat de maintenance automate	1		5 357,60 €
contrat de maintenance séquenceur	1		13 180,00 €
Infrastructure	1	3 240,00 €	3 240,00 €
		TOTAL HT	**40 118,70 €**

4/ Remarques et perspectives 2009

Prestations externes

Comme en 2007, nous sommes confrontés à la concurrence des sociétés privées qui proposent des tarifs plus attractifs (5 € TTC la séquence en moyenne frais de port inclus). Ceci ce traduit par une baisse des recettes d'environ 10.000 €. L'avantage pour l'IBMP et ses partenaires est de pouvoir bénéficier de meilleurs délais de transmission des résultats (24h – 48h) pour l'ensemble des utilisateurs.

Depuis 2006 nous réalisons des travaux de séquençage à crédit pour certains laboratoires. Dans ces conditions la rentabilité de la plate-forme pourrait être compromise. Il serait judicieux de prendre des mesures pour permettre à certains laboratoires de solder leur arriéré dont le total atteint 21.000 €.

Perspectives

Test méthode de séquençage par Rolling Circle PCR (collaboration avec A. Berr)

Pour le séquençage direct à partir de colonies bactériennes, de stocks de bactérie en glycérol, de plasmides, et sans la phase de purification.

Avantages :

- très fort rendement d'amplification ;
- diminution des coûts de séquençage car omission phase de purification (ex : minipreps).

Les premiers tests réalisés montrent un excellent rendement de PCR, mais la qualité du séquençage n'est pas tout à fait celle obtenue avec une purification. A suivre.

Plate-forme Q-PCR

Abdelmalek ALIOUA

Plate-forme Q-PCR
ALIOUA ABDELMALEK

1/ Présentation

2007 : Mise en place d'une plate-forme pour l'analyse d'expression de gènes par PCR quantitative en temps réel

Personnel
- Mr Alioua Abdelmalek – Ingénieur d'étude - IE2-CNRS, malek.alioua@ibmp-ulp.u-strasbg.fr

Equipements
-1 instrument Roche LC480 pour la PCR quantitative en temps réelle à haut débit, en plaque 384 puits (acquis en 2008)
-1 thermocycler Biorad i-cycler pour PCR en temps réelle en plaque 96 puits
-1 station de pipetage (robot biomek 3000) (acquis en 2006), utilisée également pour le séquençage d'ADN
- 1 station PC pour l'analyse des résultats

Missions
Le service est organisé en plate-forme pour l'analyse de l'expression de gènes. Ces analyses impliquent :
- Des tests de gènes référence -collection de couples d'amorces.
- Des validations des kits et réactifs
- Du design d'amorces et de sondes (taqman ou sybrgreen)
- Des réalisations et optimisation des réactions de QPCR
- Un support technique et logiciel
- Un suivi de l'évolution technologique et logicielle de la plateforme
- Une formation des nouveaux utilisateurs
- La logistique de la plate-forme et la maintenance des différents automates
- Le suivi administratif de la plate-forme

Bilan
En 2008 L'activité de la plateforme à été multiplié par 2 par rapport à l'année 2007, soit 92256 réactions réalisées pour 41 utilisateurs.
Jusqu'à 50% du temps et de la capacité totale de la plateforme sont également accessibles en libre-service pour les utilisateurs confirmés.

Equipe	nombre de réactions	% utilisation
Camara	960	1,04
Chaboute	28032	30,39
Dietrich	3840	4,16
Drouard	4992	5,41
Genschik	9120	9,89
Gilmer/Ziegler-graff	576	0,62
Kauffmann	672	0,73
Keller/Ryabova	288	0,31
Legrand	3840	4,16
Otten	192	0,21
service	1632	1,77
Shen	3552	3,85
Voinnet	33024	35,80
Werck	1536	1,66

2/ Prestations réalisées

- Test de gènes référence. A partir d'une collection de gènes ; recherche des 2 ou 3 gènes les plus stables pour un organisme donné, pour un tissu donné et dans des conditions expérimentales données. Logiciel utilisé : Genorm et calcul des ct
Ainsi la plateforme dispose de 3 sets de normalisation pour les organismes suivants :

- Arabidopsis thaliana
- Nicotiana tobaccum (tabac)
- Tuberculum (pomme de terre)

- Design d'amorces et de sondes. Pour un gène donné, recherche de couples d'amorces aillant les meilleures spécificités et efficacité en Q-PCR pour un protocole défini à l'avance. Logiciel utilisé : Universal Probe Library (Roche). Calcul de l'efficacité avec LinReg.
Au total 105 couples d'amorces ont été dessinés, testés et validés pour la PCR quantitative.

Utilisateur	nb de gènes	organisme	nb échecs
R.MENARD	3	arabidopsis	
E.DUMBLIAUSKAS	4	arabidopsis	1
E.LECHNER	14	arabidopsis	
S.OHNESORGE	1	arabidopsis	
L.OTTEN	2	arabidopsis	
P.ACHARD	10	arabidopsis	
ME.CHABOUTE	10	arabidopsis	
A.MIALOUNDAMA	2	tabac	
R.VAL	23	pomme de terre	
S.KAUFFMANN	4	arabidopsis	1
A.BERR	35	arabidopsis	1
TOTAL	**108**		**3**

- Réalisations et optimisation des réactions de QPCR. Réalisation de QPCR en microplaque 96 et 384 puits. Pipetage manuel ou automatisé selon le nombre de réactions à réaliser.

- Analyse statistique des résultats. Analyse statistique des résultats de QPCR, quantification relative par la méthode des ct. Analyse plaque par plaque ou en mode « gene study » permettant de normaliser et d'analyser une centaine de plaques en même temps pour les études portant sur un grand nombre de gènes. Logiciels utilisés : IQ5.V2 et REST-MC .

-Support technique et logiciel. Aider les utilisateurs pour la configuration et la réalisation de leur expérience, support technique pour la synthèse des cDNA. Formation à l'utilisation des différents logiciels

- Intervention orale (2H). Sous la forme d'un séminaire / débat. Présentation du procédé de la plateforme dans les différentes étapes de la PCR quantitative, débat avec les différents utilisateurs. Equipe ayant sollicité ce débat : O.Voinnet

3/ Utilisateurs pour lesquels le responsable de la plateforme à été sollicité et nature des travaux réalisés :

	Test de gènes référence	Design d'amorces et de sondes	Réalisations et optimisation des réactions de QPCR	Réalisations RT+QPCR	Analyse statistique des résultats	Support technique et logiciel
ACHARD.P	X	X	X		X	X
AZEVEDO.J	X	X	X	X	X	X
BASSARD.JE		X	X		X	X
BAUMBERGER.N	X	X	X	X	X	X
BERR.A	X	X	X		X	X
CHABOUTE.ME	X	X	X		X	X
DE RUFFRAY.P	X	X	X		X	X
DELUIS.A		X				X
DUCHENE.AM	X	X	X		X	X
DUMBLIAUSKAS.E	X	X	X		X	X
DUNOYER.P	X	X	X	X	X	X
ELFAROUK.S	X	X	X		X	X
GARCIA-S	X	X	X		X	X
GENESTIER.J	X	X	X		X	X
GIBBINGS.D	X		X	X	X	X
JAY.F			X		X	
LECHNER.L	X	X	X		X	
MEDIOUNI.C	X		X		X	
MENARD.R	X	X	X		X	X
MIALOUNDAMA.A	X	X	X		X	X
SCHEPELNIKOV.M					X	X
OHNESORGE.S		X	X		X	
OTTEN.L	X	X			X	
PAZHOUHANDEH.M	X	X	X		X	
PELTIER-C	X		X		X	
ROA.H	X					
RUIZ.V	X	X	X		X	X
VAL.R	X	X	X		X	X

4/ Bilan financier

Coût QPCR 2008

Désignation	Quantité	Prix unitaire HT	Coût HT
QPCR MasterMix +Fluoresceine	60	234,50 €	14 070,00 €
QPCR MasterMix +Rox	15	234,50 €	3 517,50 €
QPCR MasterMix +Fluoresceine X10	1	2 360,00 €	2 360,00 €
Plaque 96-AB0900	30	58,50 €	1 755,00 €
FILMS QPCR-AB1170	15	72,50 €	1 087,50 €
KIT SYBR GREEN LC480	5	200,00 €	1 000,00 €
LC480 MULTIWELL PLATE384+ FILMS	2	307,50 €	615,00 €
LC480 SYBR GREEN I MASTER	1	1 480,00 €	1 480,00 €
EmboutsAP96-P20	10	45,60 €	456,00 €
MAINTENANCE ICYCLER+ METROLOGIE	1		582,00 €
GENEX	1	565,00 €	565,00 €
Frais carboglace	4	15,00 €	60,00 €
Dessin d'amorces (sigma)	108		2180,12
		Total	**29 728,12 €**

Facturation

Base de calcul pour la tarification	
Consommables + maintenance	29 728,12 €
Amortissement du matériel (sur 5 ans)	9 800,00 €
Infrastructure (81,29€ /m2) (50%)	1 560,77 €
Total des dépenses	41 088,89 €
nb de réactions réalisées	92256
Coût unitaire, hors frais personnel	0,45 €
Frais de personnel/réaction (50%)*	1,17 €
Coût unitaire, frais de personnel inclus	1,62 €
Tarif appliqué aux partenaires	0,75 €
Tarif appliqué aux clients extérieurs non -partenaires	2,50 €

* : Les frais de personnel sont calculés sur la base de 50% du salaire annuel toutes charges comprises, car je suis à 50% sur la plate-forme de séquençage et à 50% sur la plate-forme de Q-PCR

Répartition des coûts par équipe

équipe	**nbre de réactions**	**% utilisation**	**Coût HT**
camara	960	1,04	286,66 €
chaboute	28032	30,39	8 370,46 €
dietrich	3840	4,16	1 146,64 €
drouard	4992	5,41	1 490,63 €
genschik	9120	9,89	2 723,27 €
gilmer/ziegler-graff	576	0,62	172,00 €
kauffmann	672	0,73	200,66 €
keller/ryabova	288	0,31	86,00 €
legrand	3840	4,16	1 146,64 €
otten	192	0,21	57,33 €
service	1632	1,77	487,32 €
shen	3552	3,85	1 060,64 €
voinnet	33024	35,80	9 861,09 €
werck	1536	1,66	458,66 €
Total	**92256**	**100**	**27 548,00 €**

Budget prévisionnel 2009 :

Pour 192000 réactions :

désignation	quantité	prix HT	cout HT
LC480 MULTIWELL 50X PLATE384+ FILMS	10	307,50 €	3 075,00 €
LC480 SYBR GREEN I MASTER 10X5ML	10	1 480,00 €	14 800,00 €
EmboutsAP96-P20	200	45,60 €	9 120,00 €
		Total HT	**26 995,00 €**

5/ Remarques et perspectives 2008

Utilisation de la plate-forme

La sollicitation de la plate-forme pour l'analyse d'expression de gènes à doublée par rapport à l'année dernière. L'acquisition d'un nouvel instrument à haut débit devrait également doubler les possibilités en 2009. Néanmoins la situation est parfois ingérable, il est difficile de répondre à toutes les demandes.
L'activité 2008 est globalement positive au regard des réponses apportées au chercheurs.

L'apport de la PCR quantitative est considérable, tant au niveau de la qualité des résultats que du confort et de la facilité à la mettre en œuvre. Toutefois je constate une certaine dérive. Une certaine curiosité, des analyses qui n'ont pas vraiment lieu d'être faites par PCR quantitative, ou réalisées sans réflexion préalable. Partant du principe que toute analyse ou demande d'analyse est justifiée par les chercheurs, il m'est difficile de faire la part des choses.

Il m'est également arrivé de me lancer dans des analyses de masse (une étude sur plusieurs plaques de 384 puits), pour obtenir un échec total !
Dorénavant je ne donnerais pas de suite à toute demande d'analyse n'ayant pas donné lieu à certaines vérifications pré-QPCR, notamment la validation des amorces pour la QPCR et la validation de la reverse transcription.

Perspectives 2009

Formations pratique à la QPCR. En accord avec E. Lechner, nous proposerons 2 sessions de formations pratiques afin que les utilisateurs puissent êtres autonomes en QPCR.

6/ Production scientifique

Navarro L., Jay F., Nomura K., He S. Y. and Voinnet O. Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. ***Science*,** 321(5891):964-967, 2008.

Brodersen P., Sakvarelidze-Achard L., Bruun-Rasmussen M., Dunoyer P., Yamamoto Y.Y., Sieburth L. and Voinnet O. Widespread translation inhibition by plant miRNAs and siRNAs. ***Science***, 320:1185-1190, 2008.

Achard P., Gong F., Cheminant S., Alioua M., Hedden P. and Genschik P. The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. ***Plant Cell***, 20(8):2117-2129, 2008.

Thomann A., Lechner E., Hansen M., Dumbliauskas E., Parmentier Y., Kieber J., Sheres B. and Genschik P. Arabidopsis CULLIN3 genes regulate primary root growth and patterning by ethylene-dependent and independent mechanisms. ***Plos Genet***., :(sous presse), 2008.

La Camera, C. Balagué, C. Göbel, P. Geoffroy, M. Legrand, I. Feussner, D. Roby and T. Heitz. The Arabidopsis Patatin-Like Protein 2 (PLP2) plays an essential role in cell death execution and affects differentially biosynthesis of oxylipins and resistance to pathogens. **Molec Plant-Microbe Interact**. 2009, sous presse.

Médiouni C., Ben Ammar W., Houlné G., Chabouté M.E. and Jemal F. Cadmium and copper induction of oxidative stress and antioxidative response in tomato (Solanum lycopersicon) leaves. ***Plant Growth Regul***., :(sous presse), 2008.

Plate-forme Imagerie et Microscopie

Jérôme Mutterer
Mathieu Erhardt

PLATE-FORME DE MICROSCOPIE
JEROME MUTTERER & MATHIEU ERHARDT

1/ Présentation de la Plate-forme RIO d'imagerie cellulaire Strasbourg Esplanade

La plate-forme RIO d'imagerie cellulaire Strasbourg Esplanade a été créée en 1998. Son programme scientifique a pour but l'étude par différentes techniques de microscopie de l'expression spatio-temporelle de gènes d'organismes supérieurs, animaux ou végétaux, et l'étude des biomatériaux par la caractérisation des processus biophysiques et biologiques aux interfaces. La plate-forme adhère à la *charte des plates-formes technologiques en sciences du vivant* et a obtenu un label RIO en 2001, 2004 et 2006. Les missions de la plate-forme sont les suivantes :

- Soutenir l'activité de recherche des équipes internes et externes à la plate-forme.
- Développer et implanter de nouvelles méthodologies.
- Assurer la formation du personnel aux nouvelles techniques par l'organisation de formations individuelles ou collectives dans le cadre de formations permanentes CNRS.
- Participer à l'enseignement supérieur et à l'animation scientifique en direction du public.
- Assurer le bon fonctionnement du matériel commun.

Responsable scientifique : Prof. Anne Catherine Schmit, IBMP

Unités participantes :

- CNRS UPR 2357, IBMP Dr Pascal Genschik
- CNRS UPR 9002, IBMC Pr Eric Westhof
- CNRS UPR 9021, IBMC Dr Sylviane Muller
- CNRS UPR 9022, IBMC Pr Jean-Marc Reichhart
- CNRS UMR 7156, GMGM Pr Serge Potier
- UDS-INRA UMR 1131 Pr Francis Karst
- INSERM U595, Biomatériaux Dr Jean-Claude Voegel
- CNRS IFR37, INCI, Dr Paul Pevet
- Université de Strasbourg: Toutes ces unités sont conventionnées avec l'UDS

Personnel affecté à la plate-forme

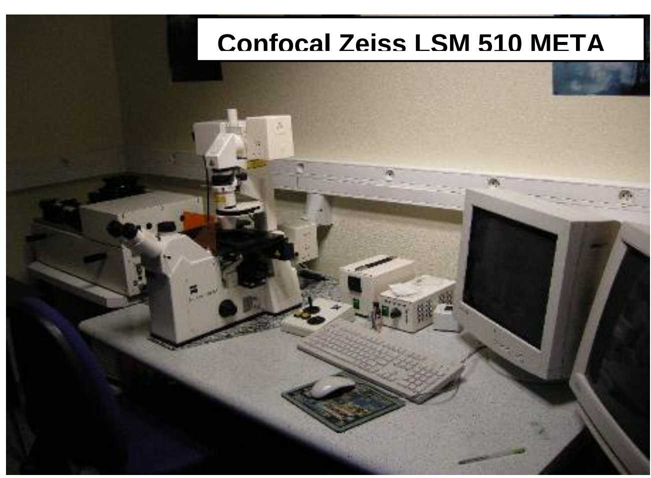
- Jérôme Mutterer, IR1 CNRS (IBMP), 100% plate-forme, Dr en Biologie Moléculaire et Cellulaire, responsable microscopie confocale, optique et imagerie.
- Mathieu Erhardt, IR2 CNRS (IBMP), 100% plate-forme, Dr en Biologie Moléculaire et Cellulaire, responsable microscopie électronique.

2/ Matériels disponibles dans la plate-forme de l'IBMP

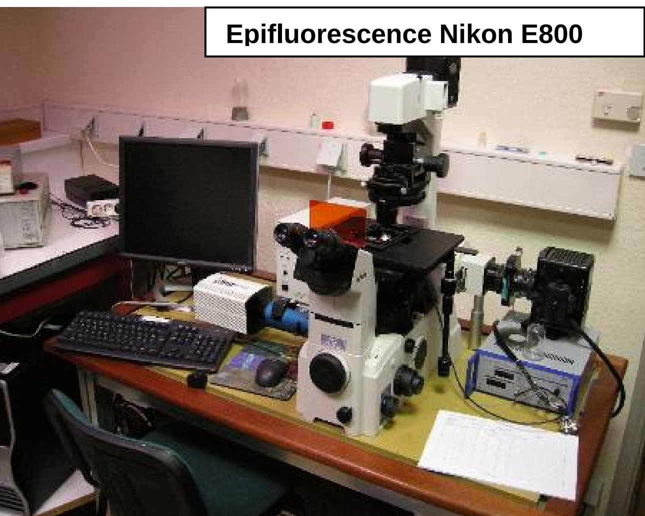
Machine	Année d'acquisition	Prix d'achat (€)	Maintenance (€)	Financements
TEM Hitashi H600	1983	100 000	8000	CNRS/IBMP
Leica DMRB	1995	32 755	0	Fondation Koerber-IBMP
Leica bino fluo	1997	12 702	0	IBMP
Nikon E800	1998	59 437	0	IBMP
Zeiss Confocal 1	1999	225 743	4000	Région Alsace-ULP-CNRS-IBMP
Nikon TE2000	2003	58 941	0	Région Alsace-PPF-IBMP
Nikon SMZ1500	2003	18 161	0	IBMP
Zeiss confocal 2	2007	243 600	4000	Région Alsace-PPF-IBMP
Leica Macroscope	2008	40 800	0	ANR-IBMP
Zeiss Apotome	2008	86 500	0	ERC-IBMP
Nikon D80	2008	1579	0	IBMP
Total		880 218	16 000	

3/ Financeurs et appareils de la plate-forme





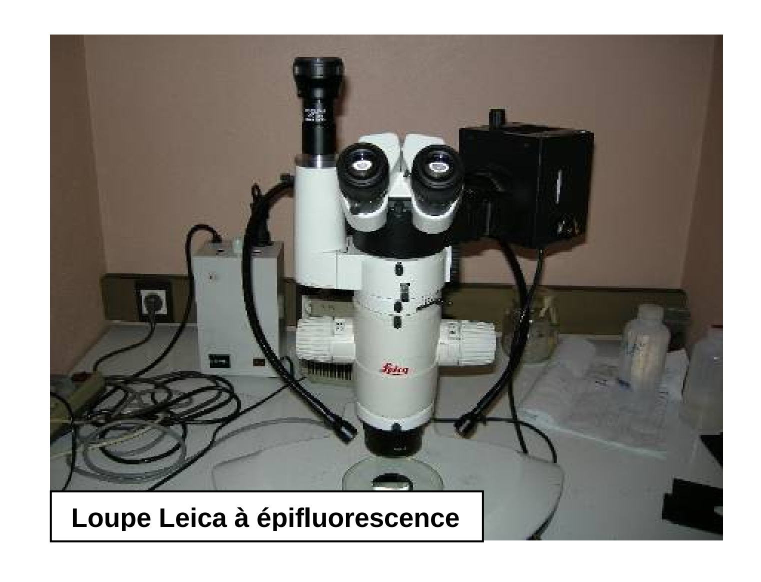




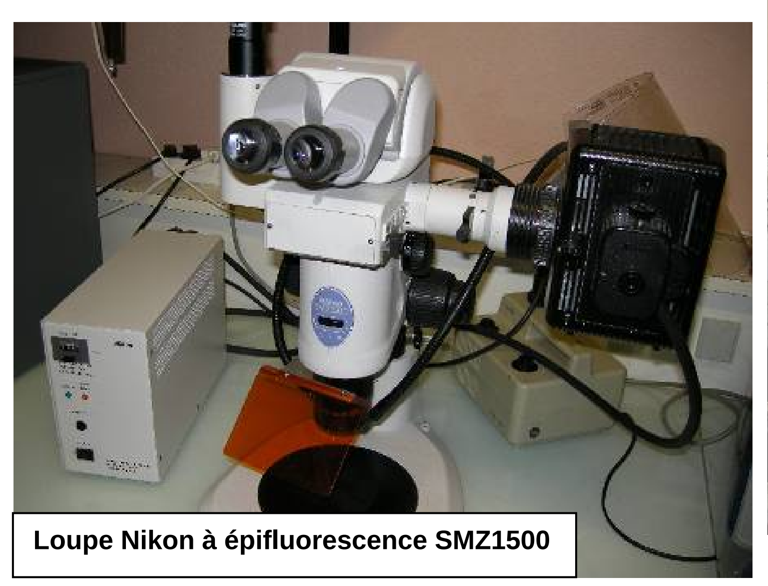





MET Hitachi H600


Loupe Leica à épifluorescence


Epifluorescence Leica DMRB


Loupe Nikon à épifluorescence SMZ1500

4/ Domaines d’intervention de la plate-forme

⇒ Biologie végétale
  - Caractérisation phénotypiques, ultrastructure
  - Biologie cellulaire
  - Interactions plantes-pathogènes

⇒ Biologie animale
  - Caractérisation phénotypiques, ultrastructure
  - Biologie cellulaire
  - Parasitologie

⇒ Microbiologie

⇒ Biomatériaux
  - Caractérisation physico-chimique
  - Analyse des propriétés biologiques

⇒ Géologie

⇒ Cristallographie

5/ Description et coût des prestations fournies par la plate-forme

Nous distinguons trois catégories de prestations cohérentes avec ce qui peut être observé sur d'autres plates-formes d'imagerie dont la nature et les tarifs ont été publiés au journal officiel du CNRS (MRI Montpellier, Institut Jacques Monod Paris, IFR40 Toulouse, RIO Toulouse, Généthon, IPMC Nice) ou communiqués directement (IGBMC Illkirch).

Coût interne et établissements publics : le calcul du coût horaire est calculé sur la base de : total des dépenses (maintenance+ consommables+coût du m2) divisé par le nombre d'heures d'observation
Coût établissements non publics : le calcul doit tenir compte du tarif horaire d'un ingénieur de recherche

		MET EPST	MET Hors EPST	Optique EPST	Optique Hors EPST	Confocal EPST	Confocal Hors EPST
consommables	a	4200	4200	3898	3898	7602	7602
contrat de maintenance	b	8000	8000	2000	2000	8000	8000
autres dépenses	c	0	0	0	0	9500	9500
montant de l'amortissement (*)	d	0	0	25460	25460	48720	48720
surface occupée	e	15	15	40	40	20	20
frais d'infrastructure (**)	g=e*f	1215	1215	3240	3240	1620	1620
total des frais annuels	h=a+b +c+d+g	13430	13430	34638	34638	75462	75462
type de prestation		heure d'utilisation	heure d'utilisation	heure d'utilisation	heure d'utilisation	heure d'utilisation	heure utilisation
nombre prestations par an	i	850	850	2000	2000	3900	3900
frais de personnel (***)	l = j*k		44		44		44
prix de revient hors personnel €/prestation	m = h/i	15,8		17,32		19,35	
prix de revient complet	l+m		59,8		61,32		63,35
Tarif de facturation €HT/prestation		16	60	18	62	20	64

(*) 20% du prix neuf HT pendant 5 ans		
(**) infrastructure €/m2	f	81
(***) personnel (€/heure)	j	44
heures de personnel par prestation	k	1

6/ Facturation 2008
Recettes externes pour la microscopie optique :

Inserm U977	15220 €
UPR9002 :	585 €
UPR9022 :	3120 €
UPR9021 :	855 €
ISIS :	577 €

Recettes externes pour le microscope électronique :

UPR9021 :	2385 €
GMGM :	180 €

7/ Activité de la plate-forme

En termes de volume, le temps d'utilisation des principaux microscopes utilisés dans la plate-forme est d'environ 6050 heures :

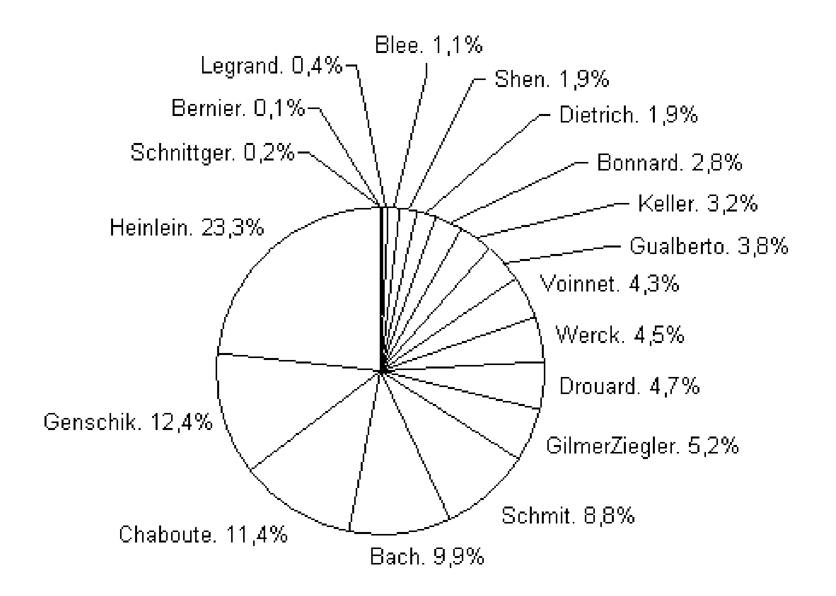
Appareil	Heures d'utilisation	Heures par jour ouvrable
Microscope confocal LSM 510-meta	1627	6,51
Microscope confocal LSM 510-405/561	2284	9,14
Microscope électronique	850 h	3,40
Nikon E800 (fond clair et fluo)	882	3,53

Les autres équipements tels que petits microscopes, loupes binoculaires ou loupe à fluorescence sont utilisés régulièrement et entretenus, mais sans contrôle d'accès.
Sur les principaux équipements, 2560 créneaux horaires ont été réservés. Sur une base de 250 jours ouvrables annuels, cela représente un total de plus de 10 expériences par jour.

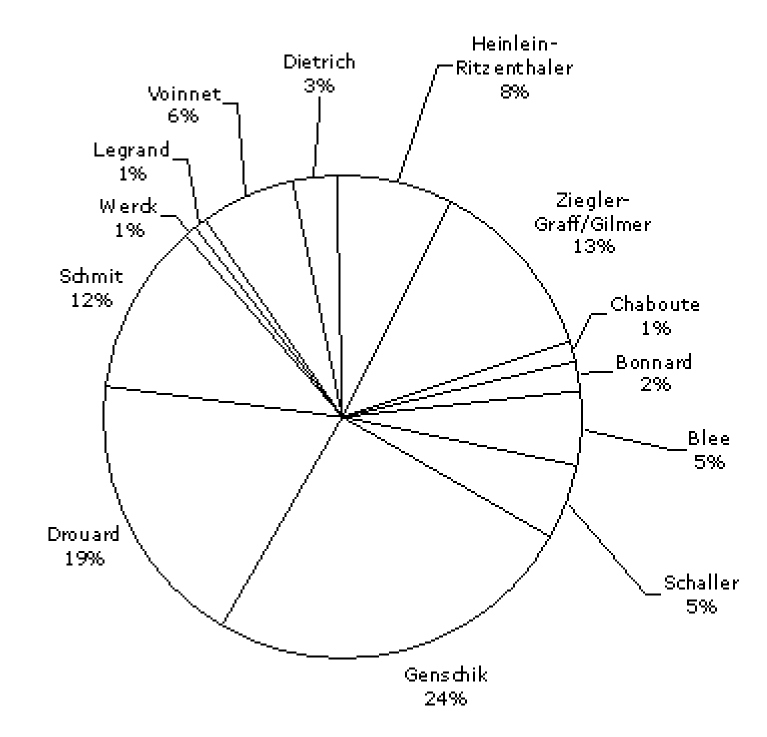
Ouverture de la plate-forme à des équipes extérieures

Cette ouverture est pour nous obligatoire vis-à-vis des partenaires ayant contribué au projet et ou au financement initial du matériel et elle est aussi un des points demandés pour l'obtention du label GIS-IBISA. L'ouverture aux équipes extérieures représente environ 16% pour la microscopie optique et atteint 23% pour la microscopie électronique.

Répartition de l'utilisation des microscopes confocaux entre les équipes IBMP.



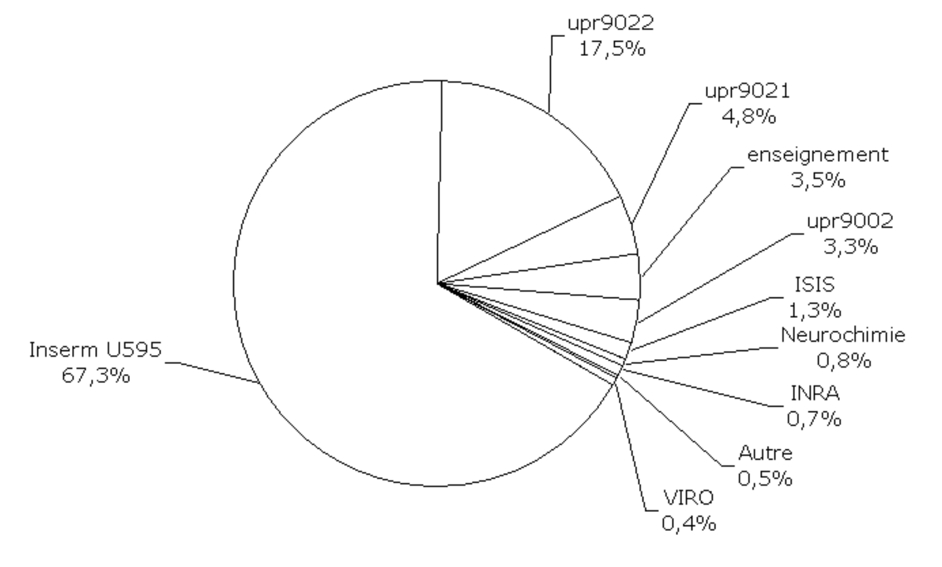
Répartition de l'utilisation du microscope électronique entre les équipes IBMP.



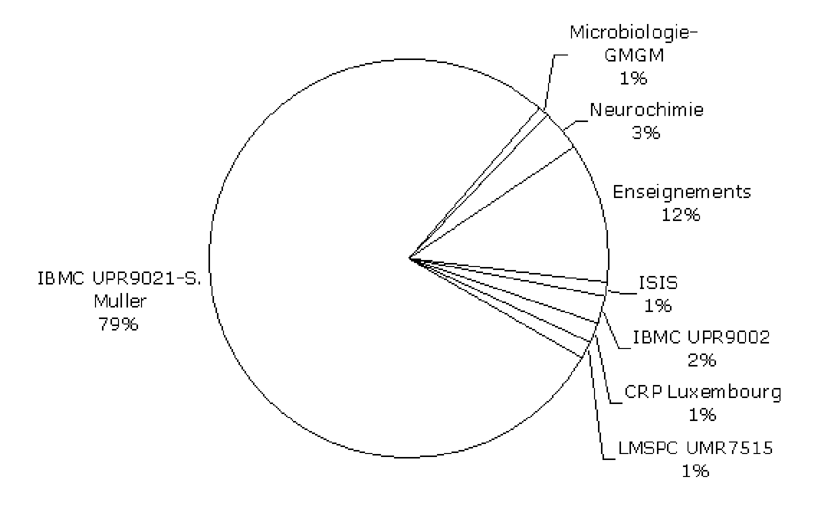
<u>Commentaires :</u>
Rappel des règles en vigueur :

1- Toute personne dûment formée peut réserver le microscope sans accord préalable.
2- Chaque équipe dispose d'un crédit permanent de 9 heures à réserver dans le futur (quota flottant par laboratoire).
3- Les plages horaires encore libres dans les 2 prochains jours sont accessibles hors quota.
4- Les plages horaires débutant après 18 h sont accessibles hors quota.

Répartition de l'utilisation du microscope confocal entre les équipes extérieures.



Répartition de l'utilisation du microscope électronique entre les équipes extérieures.



Commentaires :

Le plus gros utilisateur est l'unité dirigée par Sylviane Muller IBMC-UPR9021. Elle totalise 159 heures de microscopie électronique. Les autres équipes extérieures ne viennent que de manière très ponctuelle. Hors unité UPR9021, les équipes extérieures totalisent 32 heures et l'enseignement 23 heures.

8/ Publications

En 2008, la plate-forme a contribué aux publications suivantes :

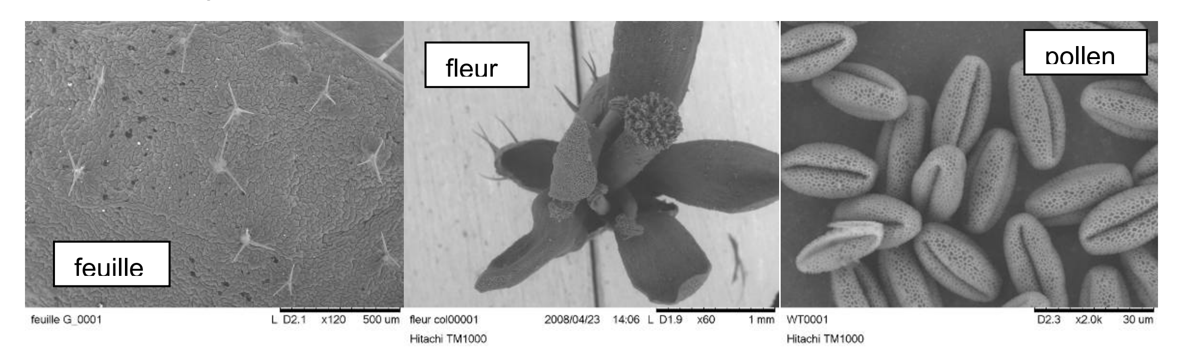
1. Thomas C. L., Bayer E. M., Ritzenthaler C., Fernandez-Calvino L. and Maule A. J. Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. ***Plos Biology***, 6(1):180-190, 2008.
2. Xu L., Zhao Z., Dong A., Soubigou-Taconnat L., Renou J.P., Steinmetz A. and Shen W. H. Di- and tri- but not mono-methylation on histone H3 lysine 36 marks active transcription of genes involved in flowering time regulation and other processes in Arabidopsis thaliana. ***Mol. Cell Biol***., 28:1348-1360, 2008.
3. Men S., Boutte Y., Ikeda Y., Li X., Palme K., Stierhof Y. D., Hartmann M. A., Moritz T. and Grebe M. Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. ***Nat Cell Biol*****,** 10(2):237-244, 2008.
4. Perez-Perez J. M., Serralbo O., Vanstraelen M., Gonzalez C., Criqui M. C., Genschik P., Kondorosi E. and Scheres B. Specialization of CDC27 function in the Arabidopsis thaliana anaphase-promoting complex (APC/C). ***Plant J***., 53:78-89, 2008.
5. Babiychuk E., Bouvier-Navé P., Compagnon V., Suzuki M., Muranaka T., Van Montagu M., Kushnir S. and Schaller H. Allelic mutant series reveal distinct functions for Arabidopsis cycloartenol synthase 1 in cell viability and plastid biogenesis. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***, 105:3163-3168, 2008.
6. Ronceret A., Gadea-Vacas J., Guilleminot J., Lincker F., Delorme V., Lahmy S., Pelletier G., Chabouté M.E. and Devic M. The first zygotic division in Arabidopsis requires de novo transcription of thymidylate kinase. ***Plant J.*****,** 53:776-789, 2008.
7. Vogler H., Kwon M.O., Dang V., Sambade A., Fasler M., Ashby J. and Heinlein M. Tobacco mosaic virus movement protein enhances the spread of RNA silencing. ***Plos Pathogens***, 4:1-12, 2008.
8. Molinier J., Lechner E., Dumbliauskas E. and Genschik P. Regulation and role of Arabidopsis CUL4-DDB1A-DDB2 in maintaining genome integrity upon UV stress. ***Plos Genet***., 4:1-12, 2008.
9. Navarro L., Bari R., Achard P., Lison P., Nemri A., Harberd N.P. and Jones J.D.G. DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signalling ***Curr. Biol.*****,** 18:650-655, 2008.
10. Rokov-Plavec J., Dulic M., Duchêne A.M. and Weygand-Durasevic I. Dual targeting of organellar seryl-tRNA synthetase to maize mitochondria and chloroplasts. ***Plant Cell Rep***, 27:1157-1168, 2008.
11. Ungru A., Nowack M. K., Reymond M., Shirzadi R., Kumar M., Biewers S., Grini P. E. and Schnittger A. Natural variation in the degree of autonomous endosperm formation reveals independence and constraints of embryo growth during seed development in Arabidopsis thaliana. ***Genetics*****,** 179(2):829-841, 2008.
12. Achard P., Renou J.P., Berthomé R., Harberd N.P. and Genschik P. Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species.***Curr. Biol.*****,** 18:656-660, 2008.
13. Bandyopadhyay S., Gama F., Molina-Navarro M. M., Gualberto J. M., Claxton R., Naik S. G., Huynh B. H., Herrero E., Jacquot J. P., Johnson M. K. and Rouhier N. Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. ***Embo J***., 27:1122-1133, 2008.
14. Brandner K., Sambade A., Boutant E., Didier P., Mély Y., Ritzenthaler C. and Heinlein M. Tobacco mosaic virus movement protein interacts with green fluorescent protein-tagged microtubule end-binding protein 1 (EB1). ***Plant Physiol***., 147:611-623, 2008.
15. Brodersen P., Sakvarelidze-Achard L., Bruun-Rasmussen M., Dunoyer P., Yamamoto Y.Y., Sieburth L. and Voinnet O. Widespread translation inhibition by plant miRNAs and siRNAs. ***Science*****,** 320:1185-1190, 2008.
16. Lange H., Holec S., Cognat V., Pieuchot L., Le Ret M., Canaday J. and Gagliardi D. Degradation of a polyadenylated rRNA maturation by-product involves one of the three RRP6-like proteins in Arabidopsis thaliana. ***Mol Cell Biol*****,** 28:3038-3044, 2008.

17. Lorber B., Adrian M., Witz J., Erhardt M. and Harris J.R. Formation of two-dimensional crystals of icosahedral RNA viruses. ***Micron***, 39:431-446, 2008.
18. Sambade A., Brandner K., Hofmann C., Seemanpillai M., Mutterer J. and Heinlein M. Transport of TMV movement protein particles associated with the targeting of RNA to plasmodesmata. ***Traffic***, :(sous presse), 2008.
19. Hofer R., Briesen I., Beck M., Pinot F., Schreiber L. and Franke R. The Arabidopsis cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid omega-hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. ***J Exp Bot***, 59(9):2347-2360, 2008.
20. Alkhalfioui F., Renard M., Frendo P., Keichinger C., Meyer Y., Gelhaye E., Hirasawa M., Knaff D. B., Ritzenthaler C. and Montrichard F. A novel type of thioredoxin dedicated to symbiosis in legumes. ***Plant Physiol***, 148:424-435, 2008.
21. Haas G., Azevedo J., Moissiard G., Geldreich A., Himber C., Bureau M., Fukuhara T., Keller M. and Voinnet O. Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. ***Embo J.***, 27:2102-2112, 2008.
22. Jakoby M. J., Falkenhan D., Mader M. T., Brininstool G., Wischnitzki E., Platz N., Hudson A., Hulskamp M., Larkin J. and Schnittger A. Transcriptional profiling of mature Arabidopsis trichomes reveals that NOECK encodes the MIXTA-Like transcriptional regulator MYB106. ***Plant Physiol***., 148(3):1583-1602, 2008.
23. Bouyer D., Geier F., Kragler F., Schnittger A., Pesh M., Wester K., Balkunde R., Timmer J., Fleck C. and Hülskamp M. Two-dimensional patterning by a trapping/depletion mechanism: th role of TTG1 and GL3 in Arabidopsis trichome formation. ***PLoS Biol*****,** 6:1166-1177, 2008.
24. Achard P., Gong F., Cheminant S., Alioua M., Hedden P. and Genschik P. The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. ***Plant Cell*****,** 20(8):2117-2129, 2008.
25. Sambade A. and Heinlein M. Approaching the cellular mechanism that supports the intercellular spread of Tobacco mosaic virus. ***Plant Signaling Behavior*****,** :(sous presse), 2008.
26. Niehl A. and Heinlein M. Impact fo RNA virus infection on plant cell function and evolution. ***Ann. NY Acad. Sci***., :(sous presse), 2008.
27. Raffaele S., Vailleau F., Leger A., Joubes J., Miersch O., Huard C., Blee E., Mongrand S., Domergue F. and Roby D. A MYB transcription factor regulates very-long-chain fatty acid biosynthesis for activation of the hypersensitive cell death response in Arabidopsis. ***Plant Cell*****,** 20(3):752-767, 2008.
28. Babiychuk E., Bouvier-Navé P., Compagnon V., Suzuki M., Muranaka T., Van Montagu M., Kushnir S. and Schaller H. Albinism and cell viability in cycloartenol synthase deficient Arabidopsis ***Plant Signaling Behavior*****,** 3(11):978-980, 2008.
29. Vos J. W., Pieuchot L., Evrard J. L., Janski N., Bergdoll M., de Ronde D., Perez L. H., Sardon T., Vernos I. and Schmit A. C. The plant TPX2 protein regulates prospindle assembly before nuclear envelope breakdown. ***Plant Cell***, 20:2783-2797, 2008.
30. Xu Lin and Shen Wen-Hui Polycomb silencing of KNOX genes confines shoot tem cell niches in Arabidopsis. ***Current Biology***, 18:1966-1971, 2008.
31. Aouad G, Crovisier JL, Damidot D, Stille P, Hutchens E, Mutterer J, Meyer JM, Geoffroy VA. Interactions between municipal solid waste incinerator bottom ash and bacteria Pseudomonas aeruginosa. ***Science of the Total Environnement,*** 393(2-3):385-93, 2008.

9/ Veille technologique

- Un confocal rapide (à disque de Nipkow) a été demandé au PPF 2009-2012 pour l'imagerie des évènements intra-cellulaires rapides tels que le trafic de vésicules et la dynamique du cytosquelette.
- Notre premier microscope confocal a été acquis en 1999. Grâce à la reconnaissance de la plate-forme bénéficions d'une offre exceptionnelle de mise à jour de cette station d'imagerie, en partenariat avec la société Carl Zeiss France. L'installation d'un microscope LSM700 nous permettra de rester à la pointe de la technique de microscopie confocale.
- La plate-forme de microscopie a organisé une démonstration de mini microscopes électroniques à balayage (mini-MEB). Durant deux jours, de nombreux échantillons ont été observés, et les utilisateurs ont pu comparer les performances de trois appareils : Hitachi, FEI, Hirox. Un projet avait été déposé pour l'achat d'un tel appareil auprès du conseil scientifique de l'université, mais le financement de 50 000 euros demandé n'a pas été obtenu en 2008. Ce type d'appareil permet d'imager rapidement la surface d'échantillons vivants, sans réaliser de préparation au préalable.

Exemples d'images obtenues avec un mini-MEB



10/ Formations organisées en 2008

- **Formation traitement d'images avec ImageJ (5 x 2 jours, 54 participants)**
- **Formation Cryopréparation (3 jours) (5 participants)**

11/ Démarche qualité

Dans le cadre du projet 'Qualité en Recherche – CONECTUS', la plate-forme IBMP s'est engagée au cours de l'année 2008, dans une démarche Qualité avec le soutien d'un consultant (Philippe Turnani HIPOS Consultants). Après la réalisation de l'état des lieux de la plate-forme, la documentation a été revue et mise en conformité pour les documents de base : fiche utilisateur, formation, cahiers d'utilisation, manuel d'utilisation des appareils, procédures, protocoles.
Avec la mise en place de cette étape, la plate-forme peut maintenant s'engager dans une seconde phase : celle de l'amélioration continue de la qualité.

12/ Budget prévisionnel

- Mise à jour de l'ancien confocal Zeiss LSM510- Meta (1998) par un nouveau confocal LSM700. 110000 euros
- microscopie électronique à transmission : contrat de maintenance 8000 euros
- révision ultramicrotome 1200 euros
- consommables TEM (selon réaffutages etc.) 4000 euros
- consommables Optique (selon pannes lasers etc.) 11000 euros
- Remplacement des 2 écrans phosphore du microscope électronique (écran de visualisation et écran de la caméra) : env. 3000 euros.
- un objectif zoom polyvalent pour l'appareil photo D80. (nous n'avons pour l'instant qu'un objectif macro) env. 500 euros
- Mini MEB. env. 50.000 euros

13/ Problèmes – Remarques

Demandes de postes :

- La plate-forme de microscopie souhaiterait recruter un personnel supplémentaire de type IE pour la réalisation d'expériences prioritaires de certains projets
- Il faudrait prévoir le remplacement de Denise Meyer dont le départ à la retraite est prévu pour 2009 afin de conserver l'expertise en cytologie et histologie végétale.

Plate-forme Cytologie

Denise MEYER

PLATE-FORME DE CYTOLOGIE
DENISE MEYER

La plate-forme propose des études cytologiques et histologiques ainsi que diverses analyses dont l'hybridation *in situ* et l'immunocytolocalisation, pour obtenir des images de tissus biologiques en microscopie photonique. Les utilisateurs sont essentiellement de l'IBMP

1/ Mission

Effectuer des analyses histologiques et cytologiques sur coupes de tissus, ou tissus et organes entiers.

Valoriser les études biochimiques ou de biologie moléculaire en localisant des composés ou des produits de gènes, grâce aux outils indispensables que sont l'hybridation *in situ* et l'immunolocalisation.

Assurer la veille technologique de la plate-forme.

Former les utilisateurs aux techniques utilisées sur la plate-forme et les accompagner jusqu'à leur autonomie.

Mettre au point et écrire des protocoles qui sont à la disposition des utilisateurs.

Encadrer des stagiaires de tous horizons.

Mettre à la disposition des utilisateurs des documents bibliographiques et photographiques, notamment sur les différents stades du développement des plantes.

Pour l'hybridation *in situ*, disposer d'un stock de marqueurs moléculaires (ex : wuschel, stm pour le méristème, aintegumenta pour les téguments des ovules etc…) qui servent de contrôle et permettent une localisation plus précise des gènes étudiés par les utilisateurs de la plate-forme, notamment au cours du développement des plantes.

Constantes mises au point de nouvelles techniques pour améliorer les analyses. Un stage à l'INRA de Versailles (plate-forme de cytologie), m'a permis d'affiner des techniques et de ramener à l'IBMP de nouveaux protocoles d'études des plantes.

Préparation des travaux pratiques (Hybridation *in situ* sur fleurs de Nicotiana tabacum) pour les étudiants de master I

Encadrement d'une stagiaire Marie GERBER ,1ere année biotechnologie Lycée Rostand Strasbourg du 9 au 27 juin 2008.

Je suis affectée à la plate-forme à 50%. Pendant l'autre mi-temps je mets mes compétences en cytologie au service du groupe de Wen-Hui SHEN.

2/ Equipement disponible à la plate-forme

Un microtome motorisé Leica RM 2155 (4500 $ US)
Un microtome manuel Reichart-Jung AG Heidelberg (ancien modèle)
Un four à hybridation Bioblock Scientific (1400 euros)
Deux étuves Memmert (étuve à paraffine) (700 et 500 euros)
Une étuve Jouan (400 euros)
Une loupe binoculaire Zeiss Stemi 2000 (900euros)
Une loupe binoculaire Nikon équipée d'un appareil photo Nikon coolpix P5000 (
Une étuve à vide Flam et Cie
Une platine chauffante Kunz HP-3 (535 euros)
Un déplisseur à eau rond kunz HIS-2 (655 euros)
Un microscope inversé Nikon TMS (950 euros)

3/ Prestations de la plate-forme : études histologiques d'une plante

Matériel frais

Avec ou sans fixation
Etude histologique des différents tissus par

- simple observation entre lame et lamelle de tissus entiers comme les racines, les feuilles, les plantules, les fleurs ou une coupe à main levée de tiges ou autres tissus. Pour comparer plantes sauvages et mutant
- Après coloration ex : Bleu de toluidine, éosine ou autre
- Visualisation au microscope à fluorescence, de structures en utilisant le DAPI (noyaux), le calcofluor et l'iodure de propidium (parois)

- Mise en évidence de structures particulières comme la lignine dans les faisceaux conducteurs (phloroglucinol) ou l'amidon (lugol) ou les lipides (rouge Soudan)
- Mise en évidence de tanin, cristaux, sable grâce à des réactifs spécifiques
- Coloration spécifique de grains de pollen (Alexander staining)
- Observation des échantillons après révélation GUS

Sur coupes (Après inclusion en paraplast)

Fixation des échantillons
Déshydratation
Inclusions
Coupes au microtome
Dans le but :

- Colorer et mettre en évidence les différents types cellulaires d'un tissu
- Affiner des observations après révélation GUS pour localiser plus précisément le précipité bleu

Etudes spatio-temporelles de l'expression d'un gène

Localisation des protéines : IMMUNOCYTOLOCALISATION

Inclusion en paraplast
Coupes microtome

Immunocytolocalisation

-déparaffinage
-prétraitement
-anticorps primaire
-anticorps secondaire
-révélation
-observation et photos

Pour localiser les ARN messagers : HYBRIDATION *in situ*

Préparation des sondes marquées :
-transcription in vitro des ARN anti sens marqués à la digoxigénine ou Biotine ou FITC
- estimation quantité des sondes
- raccourcissement des sondes par hydrolyse alcaline

Hybridation *in situ* sur coupes (HIS)

Déparaffinage
Prétraitement
Hybridation
Lavages stringents
Révélation des hybrides par immunologie (Ac anti DIG, anti biotine, anti FITC)
Observation et photos

Hybridation *in situ* *in toto* (WISH)

Expériences réalisées en tubes ou paniers (strainers)
Protocoles comme pour HIS sur coupes mise à part :
Fixation spécifique des échantillons entiers
Prétraitement à l'histoclear

Technique des empreintes

Pour avoir un rapide aperçu de la présence et de la localisation d'une protéine dans des tiges, des pétioles, des feuilles, une empreinte est effectuée sur de la nitrocellulose.
La suite de l'expérience se déroule comme un western blot.

4/ Utilisateurs de la plate-forme cytologie

Utilisateurs extérieurs :
Université de Strasbourg (UDS) STRASBOURG
Université Haute Alsace (UHA) COLMAR

Utilisateurs IBMP

Chercheur	Equipe
HOLVEC S.	D. Gagliardi
IMBAULT Patrice	J. Gualberto
GIEGE Philippe	G. Bonnard
BASSART Jean-Etienne	D. Werck
COMPAGNON Vincent	D.Werck
MICHYIO	D. Werck
OLRY Alexandre	D. Werck
GRIENENBERGER E	M. Legrand
BARTOLAMIOL D.	V. Ziegler
DUNOYER Patrice	O. Voinnet
GILMER D.	
SMETANA Ondrej	M.E. Chaboute
DUMBLIAUSKAS E.	P. Genschik
MAROCCO K.	P. Genschik
CRIQUI M.C	P. Genschik
LECHNER Esther	P. Genschik
XU Lin	WH Shen
BERR Alexandre	WH. Shen
BARBIER H.	A. Schnittger
BOUVIER Fl	B. Camara
SCHALLER Hubert	T. Bach

5/ Publications

Shiming Liu, Yu Yu, Ying Ruan, Denise Meyer, Michel Wolff, Lin Xu, Ning Wang, andre Steinmetz and Wen-Hui Shen. Plant SET- and RING- associated domain protein in heterochromatinization
The Plant Journal 2007 52, 914-926

Bortolamiol D., Pazhouhandeh M., Marrocco K., Genschik P. and Ziegler-Graff V. The Polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. **Curr. Biol**., 17(18):1615-1621, 2007.

Xu L. and Shen WH Polycomb silencing of KNOX genes confines shoot stem cell niches in Arabidopsis **Curr. Biol.** 2008 18 , 1966-1971

XU, L., ZHAO, Z., DONG, A., SOUBIGOU-TACONNAT, L., RENOU, J.-P., STEINMETZ, A. and SHEN, W.-H. (2008) Di- and tri- but not mono-methylation on histone H3 lysine 36 marks active transcription of genes involved in flowering time regulation and other processes in *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Cell. Biol.,** 28, 1348-1360.

CYP86B1 is required for very long chain □-hydroxyacids and □,□-dicarboxylic acids synthesis in root and seed suberin polyester. Vincent Compagnon*, Patrik Diehl*, Irène Benveniste, Denise Meyer, Hubert Schaller, Lukas Schreiber, Rochus Franke and Franck Pinot. **Plant Physiol**. 2008

Xu L., Ménard R., Berr A., Fuchs J., Cognat V**.,** Meyer D. and Shen W.H. The E2 ubiquitin-conjugating enzymes AtUBC1 and AtUBC2 play redundant roles and are involved in activation of FLC expression and repression of flowering in Arabidopsis Thaliana. **Plant J**.,57(2), janv. 2009.

6/ Consommables 2008

	désignation	PRIX
MATERIEL	pinces	36,00 €
	fixateur	120,00 €
	Mat. Inclusion + coupes	520,00 €
CHIMIE	proteinase K	21,80 €
	calcofluor	33,50 €
	Fast Red TR/naphtol	80,50 €
	histoclear	133,80 €
ENZYMES	T3 RNA POL	92,00 €
	T7 RNA POL	276,00 €
	Sp6 RNA pol	184,00 €
AUTRES::HIS	DIG RNA Lab mix	333,80 €
	FITC RNA Lab mix	164,86 €
	anti DIG AP	134,00 €
	substrat AP	162,00 €
	BCIP salt	87,17 €
	NBT salt	89,78 €
		2 469,21 €

Durée de différentes analyses
Une analyse cytologique demande environ 20 heures de travail réparties sur une semaine :
Fixation 1-2 heures
Deshydratation et préparation à l'inclusion 8 heures
Inclusion 1-4 heures
Coupe au microtome 2-4 heures
Coloration 2-4 heures (Déparaffinage - réhydratation – coloration - montage des lames)
Observation microscope 2-5 heures ou plus.

Une analyse de l'expression de gènes par **Hybridation in situ ou immunolocalisation** dure 15 jours à 3 semaines, une étude cytologique de 10 à 15 jours.

Plate-forme Bio-informatique

Valérie COGNAT

PLATE-FORME DE BIOINFORMATIQUE
V. COGNAT

1- FONCTIONNEMENT DE LA PLATE-FORME

La plate-forme est équipée :

- d'un Mac Pro quadri Xéon. Achat : septembre 2008. Montant : 2190 euros
- d'un accès à la plate-forme Bioimage.

Les outils utilisés sont des outils disponibles gratuitement (licences de type GNU ou similaires) :

- EMBOSS
- Logiciels d'alignements : Clustal, Muscle, Jalview
- Logiciels de phylogénies et visualisations d'arbres : Phylips, phyML, treedyn
- Recherche de similarités : NCBI-blast, wu-blast
- Recherche de motifs : PatMan

La licence avancée Genevestigator pour l'analyse des données d'expression a été renouvelée pour l'année 2009.

2- PRESTATIONS DE LA PLATE-FORME

L'activité de la plate-forme est axée principalement sur :
- L'analyse des données biologiques : analyse de séquences (recherche de similarités, alignement, recherche de motifs, analyse fonctionnelle, prédiction de structures secondaires, phylogénie), analyse des données de transcriptome, …
- Le développement et la mise en place d'outils et bases de données spécifiques.
- La formation des utilisateurs aux méthodes et outils bioinformatiques.

3- RECETTE ET COUT FINANCIER

Les activités de la plate-forme ne sont pas facturées.

Le coût de la Plate-forme pour l'année 2008 est de 2660 euros, il se compose :
- du renouvellement de la Licence Genevestigator – Avancé (10 utilisateurs) : 470 euros.
- du renouvellement de ma station de travail : 2190 euros

4- UTILISATEURS DE LA PLATE-FORME ET THEMATIQUES ABORDEES

La plate-forme est utilisée principalement par l'IBMP. Elle est toujours très sollicitée, que ce soit de manière ponctuelle (analyses de séquences, analyses phylogénétiques et analyses de données de puces à ADN essentiellement) ou pour une implication plus importante dans un projet de recherche [ex : Annotation de banques de petits ARNs – Equipe O. Voinnet].

- **Les principales thématiques abordées en 2008**

Groupes	Equipes	Thématiques	% par équipe	% par groupe
Virologie	O. Voinnet	Développement d'outils pour l'annotation et l'analyse de banques de petits ARNs	30,10	31,83
	C. Ritzenthaler	Analyse de protéines dbDUF26	1,73	
Mitochondries	L. Drouard	Analyse des SINEs chez Chlamydomonas (1)	6,23	9,52
	G. Bonnard	Phylogénie des protéines MRPP3	1,90	
	D. Gagliardi	Analyse des protéines Cid	1,38	
Biologie Cellulaire	M.E. Chaboute	Phylogénie des protéines BCD3	2,25	14,01
	P. Genschik	Analyse des protéines WD40-DDBbox Phylogénie de la protéine MSI1	8,48	
	W.H. Shen	Analyse de puces	3,11	
	L. Otten		0,17	

Groupes	Equipes	Thématiques	% par équipe	% par groupe
Réponses métaboliques	M. Legrand	Phylogénie des protéines BAHD	3,11	5,88
	E. Blée	Phylogénie de protéines CLO	0,69	
	S. Kauffmann	Analyse de puces	2,08	
Plate-forme Protéomique	P. Hammann	Mise en place du logiciel PrIMS	3,11	3,11
Extérieur	Reichhart	Annotation de banques de petits ARNs	3,46	3,46
Formation	Formation ULP	Introduction à la Bioinformatique - M1	2,08	2,08
Plate-forme Bioinformatique	Veille technologique	Bibliographie – tests logiciels	9,69	30,10
	Serveur Xsan-Bioimage	Mise à jour - configuration	20,42	

- **Les publications au titre de l'années 2008**

- Xu L, Ménard R, Berr A, Fuchs J, Cognat V, Meyer D, Shen WH. The E2 ubiquitin-conjugating enzymes, AtUBC1 and AtUBC2, play redundant roles and are involved in activation of FLC expression and repression of flowering in Arabidopsis thaliana. **Plant J**. 2008 Oct 14.
- (1) Cognat V, Deragon JM, Vinogradova E, Salinas T, Remacle C, Maréchal-Drouard L.
On the evolution and expression of Chlamydomonas reinhardtii nucleus-encoded transfer RNA genes. **Genetics**. 2008 May;179(1):113-23.
- Lange H, Holec S, Cognat V, Pieuchot L, Le Ret M, Canaday J, Gagliardi D. Degradation of a polyadenylated rRNA maturation by-product involves one of the three RRP6-like proteins in *Arabidopsis thaliana.* **Mol Cell Biol.** 2008 May;28(9):3038-44.

- **La mise en place du serveur**

Depuis fin 2007 la plate-forme exploite le serveur XSan-Bioimage, principalement pour la mise en place d'outils d'annotation pour les données issues du séquençage haut débit de type 454 et Solexa (la masse de données nécessitant la capacité de calcul du serveur). La mise en place du serveur prend donc une part non négligeable de l'activité de la plate-forme, d'autant plus devant les questions purement techniques et l'absence d'informaticien dans l'institut pouvant répondre à ces besoins.
L'année 2008 a été marquée par une mise à jour importante de l'architecture du serveur qui a donc demandé du temps pour mettre en place les modifications et la réinstallation d'outils.
De plus d'autres équipes (internes ou externes) impliquées dans le projet Xsan-Bioimage font également appel à la plate-forme bioinformatique pour l'installation de leurs outils et bases de données (logiciel PrIMS pour la plate-forme de Protéomique, outils d'annotation des banques issues du séquençage haut débit pour l'UPR 9022).

Le serveur dispose maintenant d'un certain nombre d'outils et de librairies bioinformatiques. Les outils développés dans le cadre de l'annotation et de l'analyse des banques de petits ARNs sont disponibles en intranet sur le serveur, permettant ainsi aux biologistes d'être autonomes dans leurs utilisations (http://bioimage.u-strasbg.fr/bioinfo).

5- VEILLE TECHNOLOGIQUE

Il y a toujours un gros travail de bibliographie et de tests de logiciels dû aux nombreuses publications dans le domaine et aux nombreux outils associés.

6- BUDGET PREVISIONNEL

Renouvellement de la licence Genevestigator fin 2009 : < 500 euros
Consommables : < 100 euros
Participation à un congrès bioinformatique : ~500 euros

7- REMARQUES ET PERSPECTIVES

L'arrivée d'une informaticienne début 2009 devrait me permettre de me libérer d'une partie des installations et configurations purement techniques du serveur ou tout du moins bénéficier du support nécessaire pour les réaliser. Elle permettra également que les installations pour les extérieurs ne passent plus systématiquement par la plate-forme bioinformatique.

Une stagiaire bioinformatique a été embauchée par O. Voinnet et mise sous mon encadrement pour mettre en place une base de données pour le stockage et l'exploitation des banques de petits ARNs.

Plate-forme Biologie structurale

Marc BERGDOLL

PLATE-FORME DE BIOLOGIE STRUCTURALE
MARC BERGDOLL

1/ Objectifs
Les objectifs de cette plate-forme sont divers. Ils consistent à :

- sensibiliser les chercheurs aux relations structure-fonction,
- les aider à exploiter le plus efficacement possible les milliers de structures cristallographiques connues à ce jour i.e. récupérer, visualiser et analyser les structures des macromolécules biologiques qui les intéressent,
- modéliser par homologie ou déterminer des structures par diffraction des rayons X,
- docker des substrats dans le site actif d'une molécule donnée.
-

2/ Expertise
L'expertise mise au service de ces objectifs est :

- maîtrise des outils d'analyse et de traitement des séquences d'acides nucléiques et de protéines,
- maîtrise des recherches et extraction des données des banques de séquences (EMBL, GENBANK, Swissprot),
- maîtrise d'outils de modélisation (Modeller), de cristallographie (O, Coot) et de visualisation (PyMOL),
- en informatique : maîtrise des systèmes UNIX/Linux, maîtrise de langages de programmation (Python, Perl),
- connaissance des technologies logicielles et matérielles liées aux réseaux (HTML, PHP et Java),
- expérience dans la gestion de bases de données relationnelles (MySQL).

Les analyses sont effectuées sur un Mac PowerPC G5et d'une station graphine Octane II.

3/ Prestation
Actuellement aucun coût de prestation n'est facturé.

4/ Activité
L'activité est résumée dans le tableau et la liste de publications suivants.

Nom du projet	Porteur du projet	Rattachement	Avancement
Aurora-TPX2	JL Evrard	CNRS IBMP	Article publié
FPPS : farnesyl diphosphate synthase de levure	F. Karst	INRA Colmar	Article soumis
SDR : 4alpha-carboxysterol-C3-dehydrogenase/C4-decarboxylase	A. Rahier	CNRS IBMP	Article accepté
GPPS : Geraniol synthase de vigne	M. Fischer	INRA Colmar	Analyse du modèle
TADA : tRNA-specific adenosine deaminase	J. Gualberto	CNRS IBMP	Article soumis
DXS : 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase	M. Hartmann	CNRS IBMP	Modélisation en cours
EBF1 et EBF2	M. Bureau	CNRS IBMP	Modélisation en cours

5/ Publications
The plant TPX2 protein regulates prospindle assembly before nuclear envelope breakdown. Vos J. W., Pieuchot L., Evrard J. L., Janski N., Bergdoll M., de Ronde D., Perez L. H., Sardon T., Vernos I. and Schmit A. C. **Plant Cell.** 2008 Oct;20(10):2783-97.

Homology Modeling and Site-Directed Mutagenesis Reveal Catalytic Key Amino Acids of 3-Hydroxysteroid-Dehydrogenase/C4-Decarboxylase from Arabidopsis thaliana. Alain Rahier, Marc Bergdoll, Genevieve Genot, Florence Bouvier, and Bilal Camara. **Plant Physiology** Preview Published on February 13, 2009; 10.1104/pp.108.132282.

Plate-forme Bio-Image

Jean-Luc EVRARD
Serge KAUFFMANN

PLATE-FORME BIO-IMAGE
JEAN-LUC EVRARD & SERGE KAUFFMANN

I. Rappel historique

La création de la plate-forme BioImage découle de la soumission et de l'acceptation du projet fédératif Xsan-BioImage par le conseil scientifique de l'ULP en 2007. Ce projet regroupait à l'époque six autres plates-formes et laboratoires à savoir : la plate-forme d'imagerie et microscopie de l'IBMP, la plate-forme de protéomique commune à l'IBMP et L'IBMC, l'unité de Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie (GMGM - UMR7156), le consortium Génolevure, le Centre Universitaire Régional de Ressources Informatiques (CURRI) ainsi que l'Herbier de l'Université Louis Pasteur et l'IBMP. Les besoins communs étaient de disposer d'un espace de stockage de données vaste et sécurisé ainsi que de possibilités de calcul importantes et souples pour les composantes.



Courant 2007, la machine a été installée à l'IBMP. Elle se composait de 3 Xserve Intel quad core pour la partie calcul et deux Cluster Node G5 et une baie Xserve RAID pour la partie SAN. L'ensemble des composants sont interfacés par du Fiber Chanel ainsi que de l'ethernet gigabit. Le cluster est protégé par un pare-feu NetASQ F200 qui assure la prévention d'intrusion ainsi que la gestion des règles d'accès à la tête de cluster. La protection de l'alimentation électrique était assurée par un onduleur 3000 VA.

Le démarrage a été un peu chaotique essentiellement pour deux raisons : d'une part, un retard dans les infrastructures nécessaires au fonctionnement de la machine et notamment de graves dysfonctionnements des installations réseau passives, et d'autre part des problèmes logiciels au niveau système qui ont mis beaucoup de temps à être correctement diagnostiqués. On peut dire que c'est plutôt tout début 2008 que l'installation s'est retrouvée conforme aux attentes pour sa partie systèmes.

Matériel / Financeur	Montant TTC
2007, achat X-SAN	
ULP	35 000 €
IBMP	7 200 €
GMGM	1500 €
Total X-SAN	43 700 €
2007, Aménagement local pour X-SAN, IBMP	6 000 €
2008, lame octo-core, UPR 9022, RIDI	5 000 €
2008, logiciels systèmes, équipe Voinnet, IBMP	5 000 €

II. Fonctions de la plate-forme

Ces fonctions peuvent *grosso modo* être segmentées en trois groupes non parfaitement étanches entre eux : la sauvegarde sécurisée de données, les bases de données image et la bio-informatique :

- La partie de sauvegarde sécurisée des données rentre dans une politique de SSI où les données produites par les laboratoires sont de plus en plus numérisées et donc sensibles aux pannes des systèmes qui les hébergent.

- La partie bases de données images concerne essentiellement la plate-forme d'imagerie et de microscopie et l'herbier. La première produit quotidiennement quelques giga-octets de données qu'il faut stocker, classer et redistribuer dans les différentes composantes s'agissant d'un matériel

fédératif. L'ambition de l'herbier est de numériser et annoter assez rapidement 10% de son fond qui est assez exceptionnel afin de le rendre disponible sur un serveur web aux scientifiques du monde entier. Néanmoins, s'agissant d'un patrimoine national, ce service sera ouvert à terme à un public beaucoup plus large.

- La partie bio-informatique concerne plus la plate-forme de protéomique, le GMGM ainsi que les laboratoires de l'IBMP. Pour la première, il faut établir une base de donnée "expérience" pour laquelle un traitement automatique devra être appliqué en fonction de l'actualisation des bases de données de séquence afin d'identifier les protéines étudiées. Le GMGM associé à Génolevure a pour tâche d'assembler et d'annoter plus d'une dizaine de génomes de levure. Pour l'IBMP proprement dit, il s'agit essentiellement de constituer des bases de données de séquences végétales spécialisées permettant de fournir des services plus en adéquation avec les recherches en cours au sein de l'institut notamment l'analyse des siRNA.

III. Labélisation

En 2008, la plate-forme a été homologuée par le CNRS comme Centre de Traitement Automatisé de l'Information. Une des conditions pour accéder à la labellisation est un fonctionnement autonome concrétisé par la formation d'un comité de pilotage composé de représentants des différentes unités, UPR, UMR et Université, à l'initiative du projet.

La labélisation est donnée pour la durée du mandat de l'Unité hôte de la plate-forme. L'IBMP ayant démarré un nouveau mandat, 2009-2013, une nouvelle demande d'homologation a été déposée en janvier 2009.

IV. Evolutions du cluster pendant l'année 2008

Deux évolutions majeures ont eu lieu en 2008 à savoir le passage de l'ensemble du cluster sous Mac OS X Server 10.5 ainsi que le rajout d'une lame octo-core Xserve supplémentaire. Ce déploiement était prévu au printemps et n'a finalement pu être réalisé qu'à l'automne pour diverses raisons. A cette occasion, un partenaire s'est rajouté avec le laboratoire du Dr. Reichhart qui a financé l'achat du Xserve supplémentaire, son installation et la mise à jour en 10.5 de l'ensemble du cluster étant financée par le groupe du Dr. Voinnet. Les buts de cette évolution étaient d'augmenter la puissance de calcul de manière significative ainsi que de passer à une architecture «UNIX certified» assurant une meilleure compatibilité de services pour certains logiciels devant être déployés.

A ce jour, le cluster a donc la configuration suivante :

- pour la partie calcul
  - 1 Xserve Intel quad 2.66 Ghz - tête de cluster
  - 2 Xserve Intel quad 2 Ghz - noeuds de calcul
  - 1 Xserve Intel octo 2.8 Ghz - noeud de calcul
- pour la partie SAN
  - 2 Cluster Node G5 - contrôleurs de métadonnées
  - 1 Xserve RAID - 5.7 To effectifs - stockage sécurisé
- pour la partie infrastructure
  - 1 switch Fiber Channel - interconnexion cluster
  - 2 switches ethernet gigabit - interconnexion réseau
  - 2 onduleurs 3000 VA - protection des micro-coupures et coupures électriques

Chaque Xserve Intel a été équipé deux disques durs où sont répliqués leurs systèmes. Ceci permet une reprise d'activité en cas de défaillance par un simple reboot.

Indépendamment de ces modifications de structure, la fusion des universités avec la création de l'UdS a conduit à la disparition *ipso facto* du CURRI comme partenaire.

V. Services déployés ou en cours de déploiement

Les premiers services déployés ont été ceux de serveur de fichiers. Une trentaine de comptes ont été créés avec les espaces disque partagés correspondants. Ils permettent aux différents groupes ou

partenaires de disposer d'un espace de stockage «privé» qu'ils utilisent à leur guise afin de protéger les données qu'ils jugent importantes. Ces espaces peuvent aussi servir de disque réseau pour réaliser la sauvegarde automatique des ordinateurs. Le passage du cluster en Mac OS 10.5 a grandement facilité cette possibilité de sauvegarde automatisée présente en standard sur ce système (Time Machine). A l'heure actuelle, de l'ordre de 3,4 To sont déjà utilisés par les différents partenaires.

Concernant la microscopie, le serveur Bio-Image a permis dès sa mise en place une amélioration de la situation du stockage des images grâce aux espaces accessibles par le serveur de fichiers. Cette situation nous permet de préserver de l'espace disque sur les postes d'acquisition, sans le risque qu'un utilisateur n'ait pas sur son poste personnel suffisamment d'espace pour sauvegarder ses images. Les cas d'images laissées pour cette raison sur les postes d'acquisition n'existent plus. Pour aller au delà, Jérôme Mutterer a testé plusieurs solutions de bases de données d'images. Notre choix s'est porté sur le système « OMERO » (http://openmicroscopy.org/). Ce système gratuit et open-source est développé par le laboratoire de Jason Sweldow (Université de Dundee, UK). Son déploiement complet et son ouverture à tous les utilisateurs pourra se faire lorsque l'administration du serveur sera sous la responsabilité de Magali Daujat qui doit rejoindre l'IBMP début février. Ce système prend en charge tous les formats d'images couramment utilisés dans les différentes plate-formes de l'institut et permet une organisation des données par laboratoires, projets et chercheurs, ainsi que le partage parmi ces entités.

Pour les usages bio-informatiques, Valérie Cognat a déployé sur la machine un certain nombre de librairies et exécutables disponibles pour l'ensemble des partenaires :

- librairies :
    - Bioperl v.1.5.2
    - ImageMagick-6.4.6
- exécutables :
    - mpich2
    - EMBOSS v.6.0.1
    - CD-hit v.3.1.0
    - Fasta v.34
    - mpiblast v.1.5
    - ncbi-blast v.8.11.0
    - wu-blast v.2.0

A ceux-ci, se rajoutent d'autres logiciels plus spécialisés pour la protéomique ou l'analyse des banques de petits ARNs :

- PrIMS (Proteomic Information Management System)
- RNAlibAnnot
- RNAlibAnalyze
- RNAlibCompare
- MultiBlast
- PrecursorExtract
- PlantTargetFinder

Pour que ces logiciels puisent fonctionner efficacement, ils sont adossés à des bases de données qui sont accessibles à l'ensemble des utilisateurs du cluster. La liste en est donnée en annexe pour information.

VI. Prospective et recommandations

Ce paragraphe a pour but de définir quelques grandes lignes de travail sur lesquelles il faudra œuvrer pour améliorer et pérenniser la plate-forme BioImage.

Le premier constat est que les besoins ressentis de longue date concernant le stockage de donnée et la puissance de calcul sont bien au rendez-vous. C'est important d'en prendre conscience car cela

révèle que cette plate-forme de relève pas d'une «lubie» mais bien d'un besoin réel et concret des équipes de recherche.

Le second point est que nous avons sous-estimé les difficultés à mettre en œuvre une telle machine. Si tous les logiciels étaient «parfait», ces difficultés seraient probablement bien moindres malheureusement tel n'est pas le cas. Dans cette première année pleine d'exploitation, il nous a manqué essentiellement une expertise dans le domaine de l'informatique pure. L'arrivée de Magali Daujat et Michel Morciano, deux informaticiens, au sein de l'IBMP devrait grandement améliorer cette situation. Il est important de créer une réelle équipe multi-compétence s'attelant à résoudre point par point certaines difficultés qui pénalisent un fonctionnement nominal du cluster.

Le réel point noir concerne la parallélisation effective des calculs. Le retard de sortie de mpiBlast ne nous a pas aidés pour trouver une solution efficace. D'autre part, bien que des équipes internationales aient déployé semble-t-il avec succès des solutions sous Mac OS X, elles n'ont donné aucune information concrète permettant de reproduire leur méthode. Il serait important de se rapprocher d'une telle équipe pour acquérir leur savoir-faire et nous permettre ainsi un bon évident de productivité.

Second point auquel nous devons rendre attentifs les utilisateurs de la plate-forme : le cluster n'est pas une machine de test mais bien une machine de production. Cela signifie que les logiciels à évaluer ou à développer doivent l'être en local sur une machine de test et qu'une fois au point, alors leur place sera sur le cluster. Ceci a pour but d'éviter autant que faire se peut des plantages du cluster ainsi qu'une monopolisation de session sur la tête de cluster.

Du point de vue matériel, la machine est capable en l'état de se voir ajouter une nouvelle lame de calcul sans investissement trop important. En revanche, l'accroissement des données sur le SAN semble effectif et il va falloir sérieusement étudier les solutions de croissance de cet espace. Cet investissement sera probablement assez lourd d'où la nécessité de le prévoir bien en amont du besoin impératif.

Dernière chose, si cet espace SAN est sécurisé face à une destruction matérielle «bénigne», il n'en est rien concernant un dommage majeur. L'idée est de pouvoir à terme «répliquer» le SAN dans un lieu physiquement situé hors de l'IBMP. Le service informatique de la Délégation Régionale du CNRS a bien œuvré fin 2008 auprès de ses instances supérieures ce qui fait qu'une salle de ressource dédiée est en cours de création, a charge normalement pour les composantes intéressées de déployer leur matériel propre. Il serait important pour la plate-forme BioImage de proposer quelque chose en ce sens notamment pour des raisons budgétaires car il semble possible d'obtenir une aide des services de la DR qui ne sera plus disponible après ce qui ressemble à une phase «pilote».

Pour résumer, la nomination de deux informaticiens est une grande chance pour un meilleur développement de la plate-forme BioImage. La clusterisation des calculs sera probablement un point prioritaire à traiter avant d'envisager sereinement une croissance de la machine. Une méthodologie en vue du déploiement logiciel sur le cluster devra être imposée aux partenaires afin de limiter les risques de dysfonctionnement pénalisant l'ensemble des utilisateurs. La réplication du SAN au niveau de la délégation régionale est aussi un chantier à mettre en route rapidement afin de bénéficier, le cas échéant, des facilités offertes aux laboratoires pilotes.

Annexe I - Bases de données disponibles sur BioImage

fastaDB :

- Arath_cdna
- Arath_cds
- Lotus_cds
- Nodul_cds

ncbi-blastDB :

- ASRP
- At_Sulphur
- Ath_cdna
- Ath_cds
- Ath_genome
- Ath_Repbase
- AtuC58_TDNA
- AtuC58
- Dmel_genome
- Dmel_MiR-GadFly
- Dmel_MiR-publi
- Dmel_MiRBase
- Dmel_MiRbaseStemLoop
- Dmel_piRNA
- Dmel_rasiRNA
- Dmel_Repbase
- Dmel_rRNA
- Dmel_sn-snoRNA
- Dmel_tRNA
- Dmel-ncRNA_GadFly-r5.4
- Human_genome
- Human_Repbase
- Lotus_aa
- Lotus_cds
- Lotus_genome
- Lotus_Repbase
- Mamm_Repbase
- MCMV_MiR
- MCMV_preMiR
- Medicago_cds
- Medicago_MiR-publi
- Medicago_MiR
- Medicago_preMiR
- MiRbase
- MiRbaseStemLoop
- Mloti_genome
- Mm_12part
- Mm_LineGf46TF
- Mm_LineL1
- Mm_mito
- Mm_Xic
- Mm_Xpart
- mm9_est

ncbi-blastDB (suite) :

- mm9_refmRNA
- Mmu_MiR-publi
- Mmu_preMiR-publi
- MmX_MiR
- MmX_preMiR
- Mouse_genome
- MouseENSEMBL_cDNA
- Murid_herpes1
- Nodul_gDNA
- Nodul_transcr
- Phi24PiT
- piRNA_Mamm
- Rodent_Repbase
- rRNA_Mamm
- rRNA_Plants
- scRNA_Mamm
- scRNA_Plants
- sn-snoRNA_Mamm
- sn-snoRNA_Plants
- Soybean_cds
- TCV
- tRNA_Mamm
- tRNA_Plants
- VZV_OKA

wu-blastDB :

- At_Sulphur
- Ath_genome
- AtuC58_TDNA
- AtuC58
- Dmel_genome
- Human_genome
- Lotus_genome
- Mloti_genome
- Mm_12part
- Mm_mito
- Mm_Xic
- Mm_Xpart
- Mm_XRP23-38N21
- Mm_XRP23-147I24
- Mm_XRP23-418O17
- Mouse_genome
- Murid_herpes1
- TCV
- VZV_OKA

Plate-forme Métabolomique

Delphine DEBAYLE
Dimitri HEINTZ

PLATE-FORME METABOLOMIQUE
DELPHINE DEBAYLE & DIMITRI HEINTZ

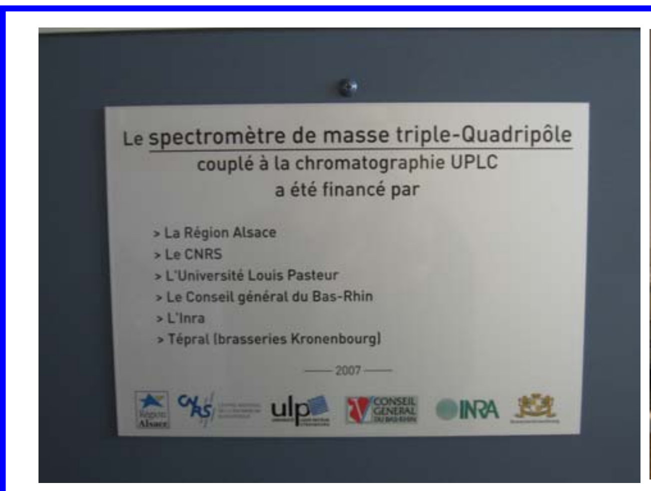
1) Résumé de l'activité

Pour sa première année de fonctionnement, la plate-forme a assumé les responsabilités suivantes :

- Développement et réalisation de nouvelles méthodes d'analyses de petites molécules issues ou non de sources végétales.
- Diffusion de l'information par l'organisation d'un séminaire, et mise en place de réunions visant à informer les groupes de recherche partenaires des possibilités analytiques offertes par la plate-forme.
- Assistance des chercheurs dans le traitement des données et dans l'exploitation des résultats, en particulier dans l'interprétation des spectres de masse.
- Assurer le bon fonctionnement des systèmes présents sur la plate-forme
- Enseignements et organisation de travaux pratiques de chromatographie et de spectrométrie de masse dans le cadre du TP de Phytochimie des M2 SNV.
- Visite aux étudiants de l'INSAIA de Nancy
- Mise en place d'un système de management de la qualité (en cours)

2/ Appareils présents sur la plate-forme

Equipements	Nature des équipements	Acquisition / tarif / Maintenance (en HT)
UPLC-MS/MS Waters Acquity/Quattro Premier XE	Chromatographie liquide/spectromètre de masse triple quadripôle	2007 / 290 000 €/ 70 784 €
HPLC-UV-Fluo Waters 626(pompe)/712(autosampler) 996(UV)/474(fluorescence)	Chromatographie liquide/détecteur UV et à Fluorescence	1997 / Assemblage de plusieurs appareils
GC-MS Agilent 6890 Series/5973Network	Chromatographie gazeuse/spectromètre de masse simple quadripôle	2001/ 89 985 €
GC-FID Varian 3900	Chromatographie gazeuse/Détecteur à ionisation de flamme	2002 / 15 250 €
GC-FID Varian 3400CX	Chromatographie gazeuse/Détecteur à ionisation de flamme	1997 / 11 540 €
GC-FID Varian 3400CX	Chromatographie gazeuse/Détecteur à ionisation de flamme	1996 / 12 470 €
GC-FID Fisons Inst 8000 series	Chromatographie gazeuse/Détecteur à ionisation de flamme	1995





UPLC-MS/MS

GC-FID

Financement:

GC/FID Varian 3900: Rhobio/IBMP

GC/FID Varian 3400 CX: IBMP/CNRS

GC/FID Fisons: EC Biotechnology

Générateur d'air pur



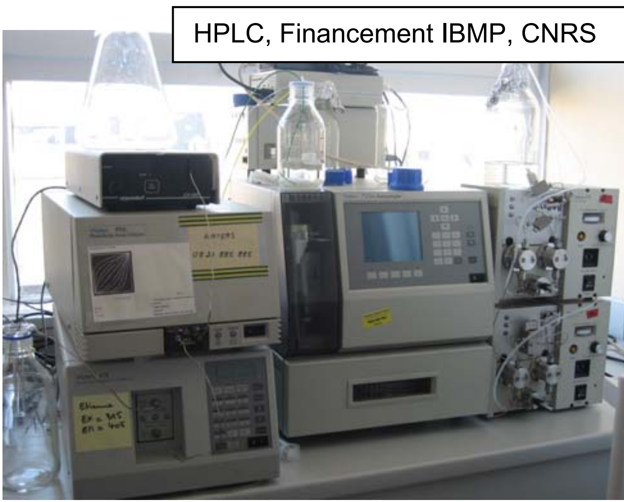
Générateur d'hydrogène



GC-MS, Financement Human Frontier



HPLC, Financement IBMP, CNRS



3) Coût des prestations

La plate-forme Métabolomique a effectué des prestations non payantes en 2008 pour l'ensemble des membres des laboratoires support de la plate-forme. Néanmoins une tarification précise des différentes prestations a été mise en place. Régulièrement, nous informons les utilisateurs du prix de revient de leurs analyses. Un certain nombre de collègues ont assuré un support financé à la plateforme.

Financements 2008 par les collègues de l'IBMP :
- **Achat de la sonde APPI/APCI,** pour molécules peu polaires et non volatiles, 20 000 euros TTC, financé intégralement par les groupes : Bach, 10 000€ ; Werck, 5000€ ; Schaller, 5000€.
- **Achats de colonnes et prés-colonnes UPLC-C18,** pour une valeur totale de 6000€. Le prix unitaire d'une colonne et pré-colonnes est de 1000€

Les acquéreurs sont : Bach, 1 ; Camara, 1 ; Kauffmann, 1 ; Werck,1 ; Legrand, 2.

Tarifs plate-forme Métabolomique (pour les détails se référer à l'**annexe 1**)

Applicable au 01/01/2009

PRESTATIONS	**TARIFS** **Membres des laboratoires supports de la plateforme**	**TARIFS** **Laboratoires publics**	**TARIFS** **Laboratoires privés**
Préparation des echantillons (chromatographie préparative: extraction fractionnement, concentration des échantillons)	20E	40E	80E
analyses par spectrométrie de masse UPLC-MS/MS cartographie massique et analyse structurale MS/MS	40E	60E	120E

4) Thématiques scientifiques abordées

Thèmes scientifiques abordés
analyses de phytohormones et du catabolisme hormonal en réponse à des conditions de stress biotique/abiotique
analyses de monoterpènes impliqués dans la réponse aux stress et au cours du développement des plantes
analyses des phytostérols et compréhension des mécanismes de stockage et compartimentalisation cellulaire chez les végétaux
analyses de sesquiterpènes impliqués dans des mécanismes du métabolisme des CyP450
analyses de flavonoïdes de fonctions inconnues exprimés différentiellement dans les plantes au cours du développement
analyses de pigments (caroténoïdes, chlorophylles) dans des mutants du métabolisme primaire et secondaire
analyses de dérivés de spermidines impliqués dans l'activité enzymatique des CyP450
analyses de phénylpropanoides impliqués dans l'activité enzymatique des CyP450
analyses de stilbénoïdes (polyphénols) impliqués dans les mécanismes de réponses aux attaques de pathogènes extérieurs

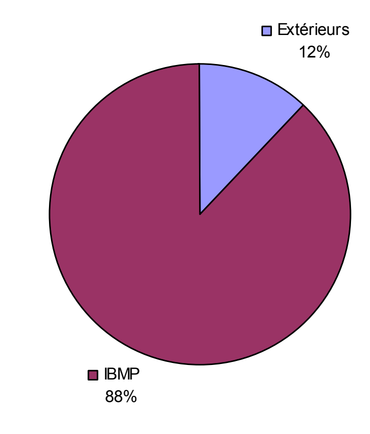
5) Utilisateurs de la plate-forme et publications

- **UPLC-MS/MS**

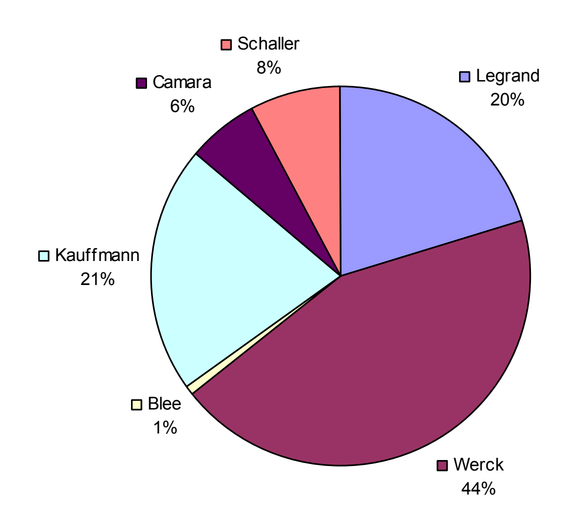
Les pourcentages d'utilisation ont été déterminés en fonction du nombre d'échantillon fournis par les différents laboratoires. Nous ne prenons pas en compte le nombre d'injections qui ont été réalisées pour chaque échantillon, Bien qu'il soit très variable d'une équipe à l'autre.
En tout, nous avons réalisé l'analyse de 446 échantillons.

Ouverture de la plate-forme à des équipes extérieures

La chaîne UPLC-MS/MS a été le seul système de la plate-forme à avoir fait l'objet d'une ouverture extérieure à des utilisateurs provenant d'autres laboratoires (publics ou privés)

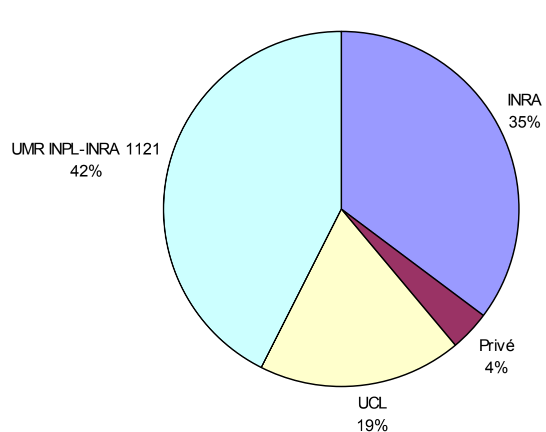


Répartition de l'utilisation du système UPLC-MS/MS entre les équipes IBMP



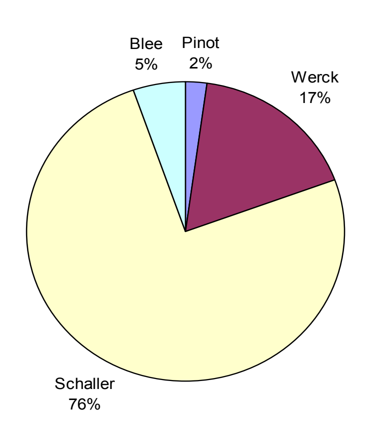
Répartition de l'utilisation du système UPLC-MS/MS entre les équipes extérieures

L'INRA, partenaire de la plate-forme ne représente qu'un tiers des utilisateurs extérieurs



- **GC-MS**

Le GC-MS a été installé sur la plate-forme courant septembre 2008.
Cet appareil n'est pas en libre service, tout comme pour l'UPLC-MS/MS, nous réalisons nous mêmes les injections pour les personnels demandeurs. Cependant il existe deux exceptions, Hubert Schaller et



Franck Pinot, qui continuent à réaliser eux même leurs injections. En ce qui concerne la maintenance du système, elle est réalisée par nos soins. Un système de réservation en ligne (via le site de l'IBMP) à été mis en place pour l'utilisation du système GC-MS.
Depuis mi-septembre, 93 échantillons ont été injectés:

- **GC-FID et HPLC-UV/Fluo**

Les GC-FID et l'HPLC-UV/Fluo présents sur la plate-forme sont en utilisation libre. L'accès n'est pas contrôlé.
Le bon fonctionnement et la maintenance des générateurs d'air et d'hydrogène sont par contre réalisés par nos soins.
Avec l'aide de Mr Morciano, le système de réservation en ligne, « ActivPlanning » a été également mis en place pour le GC-FID et la chaîne HPLC.

En 2008, les personnels de la plate-forme ont été associés à la publication suivante :

A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of Arabidopsis anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. Grienenberger E, Besseau S, Geoffroy P, Debayle D, Heintz D, Lapierre C, Pollet B, Heitz T, Legrand M., Plant J. 2009 Jan 17

6) Veille technologique

La métabolomique est une discipline nouvelle, en évolution constante, c'est pourquoi une large part de notre activité consiste à suivre les innovations techniques et analytiques qui émergent. L'acquisition de la source APCI/APPI nous a permis d'aborder la métabolomique des molécules les plus difficiles à analyser. Ces méthodes d'analyses par APPI/APCI sont très récentes (APPI est découvert en 2003). Il y a donc très peu d'informations ouvertes accessibles pour l'instant. Une veille bibliographique s'impose autour des applications de ces techniques pour glaner des informations précieuses. Des réunions avec des spécialistes sont organisées pour échanger des conseils techniques et analytiques. Enfin la diffusion de l'information est assurée par des réunions avec nos différents collègues. Présentation des outils de la plateforme lors d'un séminaire du département. A cette occasion, nous avons présenté la source APPI/APCI et ses potentialités. Nous avons assumé une charge d'enseignement sous forme de cours et de TP/TD. Nous avons accueilli les étudiants en Master 2 SNVI, dans le cadre des TP de phytochimie où nous sommes intervenus dans la partie spectrométrie de masse et chromatographie. Des cours de spectrométrie de masse et de chromatographie appliqués à l'analyse des molécules de plantes ont été dispensés tout au long de l'année 2008 aux L2 Bio Infos et aux Master 2 SNVI. Des étudiants de l'école d'ingénieur INSAIA de Nancy ont été accueillis lors d'une journée.

UPLC-MS/MS

L'acquisition d'une nouvelle source d'ionisation a été faite au sein de la plate-forme. Celle-ci a été financée par diverses équipes du laboratoire et permet d'analyser des molécules de type très variable en complément de la source classique ESI.

Il pourrait être intéressant d'ajouter un système de détection par fluorescence au système UV et masse. En effet, certaines molécules ne sont pas détectables en absorbance UV mais uniquement en détection par la fluorescence.

GC-MS

Le GC-MS, bien que très robuste, entame sa 8ème année de fonctionnement. Il existe maintenant des systèmes de masse couplés au GC beaucoup plus performants en terme de sensibilité.

L'HPLC

La chaîne HPLC est une association d'appareils de sources diverses. Plusieurs pannes sont apparues et sont difficilement réparable car certaines pièces détachées ne se font plus. Un remplacement futur serait heureux.

7) Budget prévisionnel de fonctionnement de la plateforme pour 2009

Budget de fonctionnement pour 2009 a été estimé à 24 950 euros :
Nous avons également fait une demande d'acquisition d'une centrifugeuse de paillasse (3800€) au près de la direction de l'IBMP.

Poste de dépense	€
maintenance du système d'eau	900
filtres des générateurs	900
bouteilles Hélium + cartouche	400
GC maintenance	500
3 colonnes GC	1400
5 colonnes UPLC	5200
filtres de la hotte	400
25 paquets vials UPLC ambrés	3700
25 paquets vials UPLC	3700
tubes GC	1000
solvants	6450
Filtrations & petites fournitures	400
total en euros HT	**24 950**

8) Mise en place d'un système de management de la qualité

Un consultant qualité, Philippe Turnani de la société privée HIPOS a été mis à notre disposition par la délégation du CNRS. Nous poursuivons la mise en place du système qualité de la plate-forme afin d'être éligible ISO9001.

9) Remarques et perspectives

Le système UPLC MS/MS est de loin le système analytique le plus utilisé sur la plateforme (79% des analyses ont été effectuées par ce système UPLC-MS/MS). Nous sommes extrêmement satisfaits des performances de cet outil et même surpris par la robustesse du système UPLC. Néanmoins, ce système de spectrométrie de masse n'a pas de potentialité en terme de résolution. Concrètement nous n'avons avec ce système aucune précision de la masse d'une molécule après la virgule. Par conséquent, nous ne pouvons pas exploiter les banques de petites molécules accessibles et de plus en plus représentatives. Ce manque de résolution s'avère être déjà un problème, notamment avec les groupes avec lesquels ont est le plus avancé (Werck, Camara, Schaller). Dans le futur ce manque se fera de plus en plus ressentir et obligera à externaliser une partie des analyses. En absence de résolution il est impossible d'identifier avec certitude une molécule inconnue par exemple. C'est pour ces raisons, mais aussi pour délester le système UPLC-MS/MS, que l'acquisition future d'un spectromètre de masse à haute résolution type (TOF) serait en complément une perspective heureuse. L'appareil idéal serait, un LC- Q-TOF ou un orbitrap.

Plate-forme Protéomique

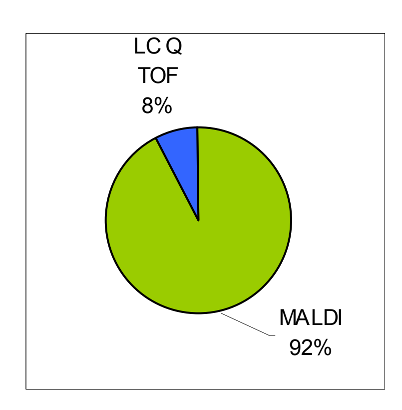
Philippe HAMMANN

PLATE-FORME PROTEOMIQUE DE L'ESPLANADE
PHILIPPE HAMMANN

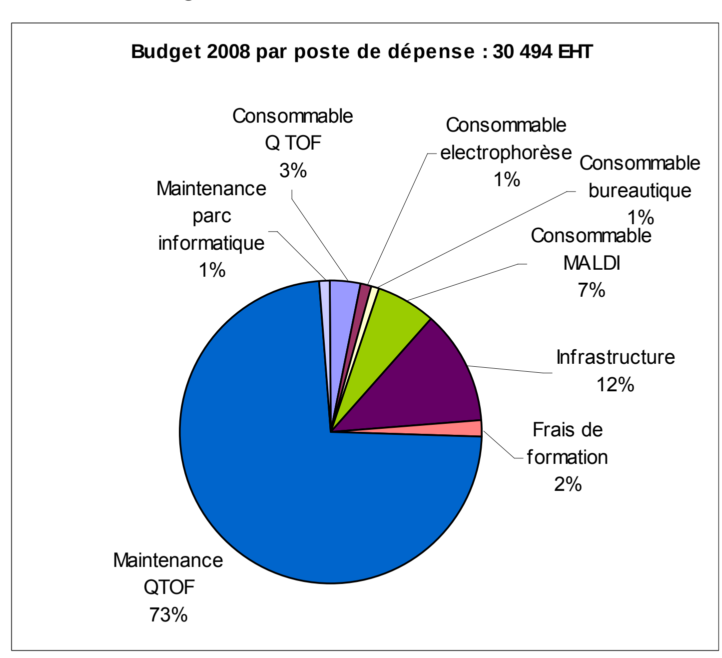
Cette plate-forme est commune avec l'IBMC, avec les instruments liés à l'analyse des masses localisés à l'IBMC, et les matériels de production et séparation des protéines localisées à l'IBMP

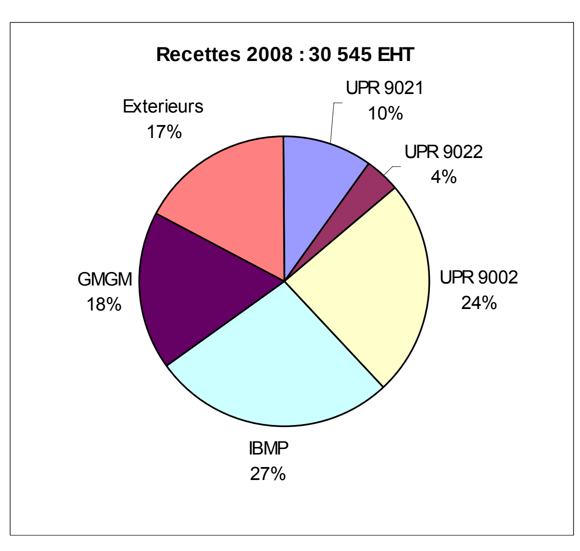
1/ Bilan des analyses

1861 analyses de spectrométrie de masse
Répartition des analyses par appareil :



2/ Bilan budgétaire





3/ Applications

Protéomique quantitative :
Analyses différentielles de l'expression protéique à partir de gels 2D,
2D « classique » : bleu colloïdal.
2D DIGE (differential in gel electrophoresis) : marquage des lysines avec Cy3, Cy5, Cy2.
Protéomique fonctionnelle :
Etude de protéines isolées par gel 2D,1D,
• Etude de PMT, en particulier les phosphoprotéines.
→ Détection des phosphoprotéines par colorant fluorescent (proQ diamond), immuno-détection, traitement phosphatase.
• Etudes de complexes protéiques
→ Experiences d'immuno-affinité, Gels bleu natif
L'ensemble des spots ou bandes protéiques générés par ces techniques sont identifiés par spectrométrie de masse par PMF (peptide mass fingerprinting).

4/ **Ressources humaines**

Des mobilités professionnelles ont modifiées la distribution des responsabilités.

Départ de Christelle Guillier le 1er septembre
Depuis le 1er septembre 2008
Philippe Hammann (IE CNRS, IBMC)
Responsable Administratif, Electrophorèse et Spectrométrie de masse MALDI.
Philippe Wolff (AI CNRS UPR 9002 IBMC).
Responsable spectrométrie de masse MALDI et LC MS MS (mi-temps).

5/ Expertise technique et Formation permanente

Le service a privilégié des formations en immersion avec application directe sur les échantillons des stagiaires. Durée de 3 jours en moyenne.
Exemples :

Formation de N.Page et J.Beyrath, doctorants de l'UPR 9021

Etude du phosphoprotéome sur cellules humaines par imagerie sur gel 2D et gel 1D, analyse quantitative.
Extraction, gels 2D et 1D résolutifs (17cm), révélation du phosphoprotéome au colorant proQdiamond, analyse d'image PDquest.

Formation de M.Bureau, post-doctorante de l'IBMP

Etude de modification post-traductionnelle de type phosphorylation
Approche analytique, visualisation d'isoformes sur blot de gel 2D (avec et sans phosphatase), analyse d'image PDquest (superposition de blot).
Approche préparative : vers une caractérisation par spectrométrie de masse

Formation de A.Ayyaz, doctorant de l' UPR 9022 (janvier 2009)

Etude du proteome extracellulaire de Serratia marcescens
Analyse quantitative et qualitative par gel 2D.

6/ Veille technologique – Instrumentation

Acquisition du nouveau MALDI TOF TOF Bruker



Autoflex III
Identification des protéines par PMF (peptide mass fingerprinting) en mode MS et par PFF (peptide fragment fingerprinting) en mode MS MS.

Taillé pour le haut débit
Installé le 28 10 2008
Coût : 240 000 EHT
2 ans de garantie, pièces, main d'œuvre et déplacement.

7/ Perspectives 2009

Nouvel espace électrophorèse – spectrométrie de masse :
Des équipements en électrophorèse, kératine free, sont à la disposition des équipes partenaires de la plateforme sur réservation.
Gel 1D, 2D, analyse d'image et excision automatisée des spots protéiques.

Spectrométrie de Masse :
Automatisation de l'acquisition et de l'identification
Analyses MS MS : formation (pour les ingénieurs) en séquençage de novo

Gestion administrative et communication :
Rédaction d'une charte d'utilisation de la plateforme
Les règles d'utilisation : se former, planifier ses manips et nettoyer le matériel après utilisation…
Création d'un Comité de pilotage
outil de communication et de veille technologique (peut-on faire ce type d'analyses ?)

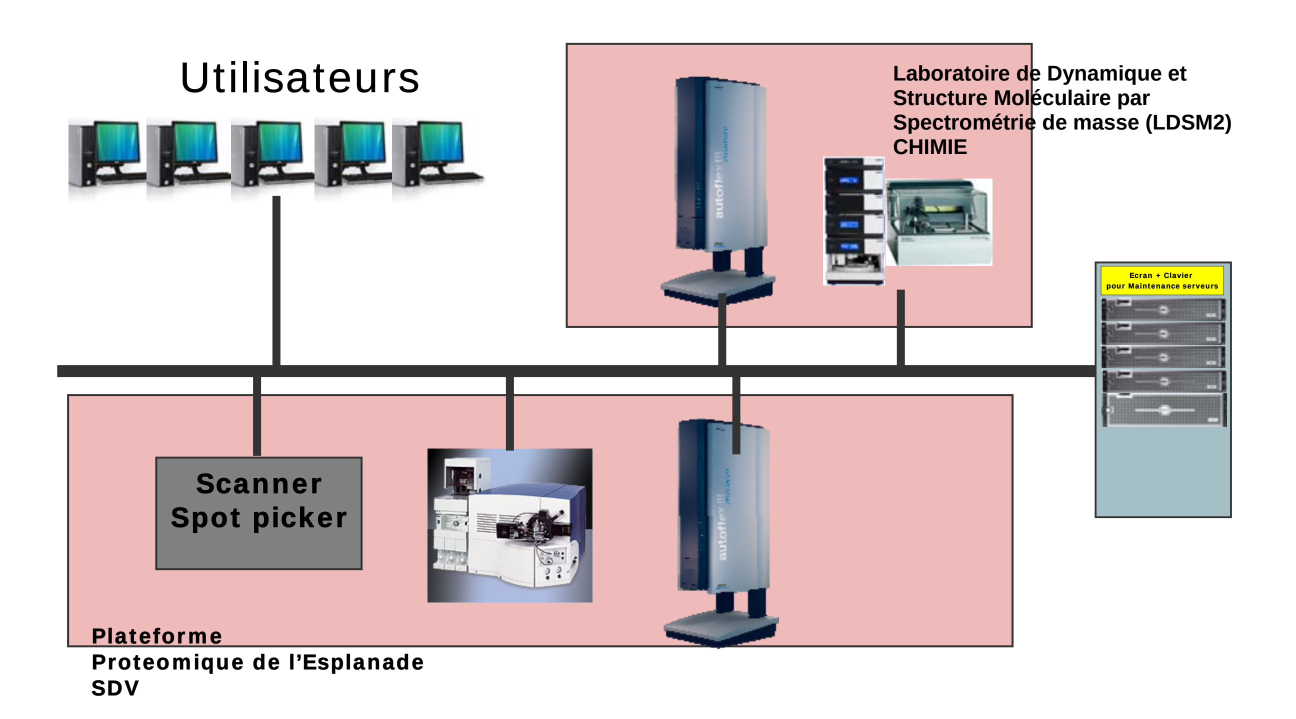
Fin du CPER 2000-2006 : environ 42 590 EHT

- 1 an de maintenance supplémentaire MALDI TOF TOF : 15 000 EHT
- Achat de matériel d'électrophorèse 12 590 EHT
- Bio-informatique : Mutualisation de moyens et d'expertise

La plateforme a connu un passage délicat depuis l'arrêt du 1er MALDI en juin 2007 jusqu'à la livraison du nouveau spectromètre en octobre 2008. Le service a pu maintenir un niveau d'analyses de masse constant grâce à la collaboration avec le groupe de recherche de spectrométrie de masse d'E.Leize basé sur le campus de l'Esplanade à Strasbourg (utilisation de leur spectromètre de masse).

Ces interactions fortes et la convergence de nos besoins communs en terme de mise en place de base de données protéomiques vont conduire pour l'année 2009 à solder le CPER par une opération d'acquisition d'un serveur commun de protéomique.

Serveur protéomique de l'Esplanade



L'objectif est d'acquérir un serveur type armoire Dell pour localiser en interne les banques de protéines nécessaires à leur identification. L'automatisation d'interrogation sera possible et permettra une analyse à haut débit.

Des logiciels de gestion de base de données protéomiques vont également être installés sur le serveur. Ces outils informatiques sont indispensables pour gérer une masse d'analyses croissante et une bonne traçabilité des résultats.

8/ Conclusion

Pour mener à bien l'ensemble de ces projets, exploiter pleinement les possibilités offertes par notre parc instrumental, il est primordial de renforcer l'équipe d'ingénieurs.
Un Poste IE profil spectrométrie de masse, spécialisé dans les approches LC MS MS a été ouvert en mobilité interne, fin 2008. Celle-ci n'étant pas fructueuse, Il est fortement souhaitable que ce NOEMI se transforme en recrutement externe 2009.

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes



12 rue du Général Zimmer – 67084 STRASBOURG Cedex
Tél : +33-(0)388 417200   Fax : +33-(0)388 614442
http://ibmp.u-strasbg.fr   upr2357@ibmp-ulp.u-strasbg.fr